

Philipps



Universität
Marburg

Regulation der zellulären Differenzierung und Ploidie von *Saccharomyces cerevisiae* durch das RNA-Bindeprotein Whi3

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sarah Schladebeck
aus Korbach

Marburg/Lahn 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2008 bis März 2013 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch am Fachbereich Biologie im Fachgebiet Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am: 06.05.2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch
Zweitgutachter: Prof. Dr. Torsten Waldminghaus

Tag der mündlichen Prüfung am: 08.05.2013

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Malcher, M., Schladebeck, S., and Mösch, H.-U. (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting growth and stress resistance in *S. cerevisiae*. *Genetics* **187**: 717-30.

Eingereichtes Manuskript:

Schladebeck, S. and Mösch, H.-U. (2013). The RNA-binding protein Whi3 is a key regulator of developmental signaling and ploidy in *S. cerevisiae*. *Genetics*.

„Somewhere, something incredible is waiting to be known.”
(Carl Sagan)

ZUSAMMENFASSUNG

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist das RNA-Bindeprotein (RBP) Whi3 an der Regulation diverser Prozesse des Zellwachstums und der Entwicklung beteiligt. Welche Signalwege und Effektoren Whi3 für diese Kontrolle beeinflusst, ist jedoch weitestgehend unverstanden und lediglich im Rahmen der Zellgrößenkontrolle näher untersucht, in der Whi3 den G1/S-Übergang durch cytoplasmatische Retention von Cdc28-Cln3 inhibiert. In dieser Studie konnten erstmals weitere Effektoren von Whi3 identifiziert werden, mit deren Hilfe das RBP die Zellzyklusprogression und Biofilmbildung steuern könnte. Unter diesen Faktoren befinden sich die G1-Zykline Cln1/2 sowie diverse Regulatoren der Biofilmbildung wie z. B. die PKA-Untereinheit Tpk1, die DYRK-Kinase Yak1 und der Transkriptionsaktivator Tec1. Dabei scheint Whi3 durch posttranskriptionelle Regulation adäquate Proteinmengen dieser Schlüsselfaktoren bereitzustellen und könnte zu diesem Zweck die Translationseffizienz beeinflussen. Interessanter Weise konnte Whi3 in dieser Arbeit erstmals mit der Kontrolle der Ploidiestabilität assoziiert werden, da *WHI3*-defiziente Stämme in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen eine erhöhte Rate von Genomduplikationen aufweisen. Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Whi3 die Genomintegrität durch Regulation der Chromosomensegregation gewährleisten könnte. So beeinflusst Whi3 sowohl die Expression diverser Kohäsionskomponenten als auch der Dynaktinuntereinheit *NIP100*. Abschließend bietet diese Studie außerdem neue Einblicke in die Whi3-vermittelte Stresskontrolle. Dabei wird Whi3 sowohl für die Stress-induzierte Expression des Oberflächenflokkuilins *FLO11* als auch die allgemeine Stressantwort benötigt und könnte dies einerseits über die DYRK-Kinase Yak1 und Msn2/4 erreichen. Ferner scheint die Deletion von Whi3 ein Yak1-unabhängiges, transkriptionelles Stresssignal zu generieren, das infolge der Genomduplikation aufgehoben wird. Zusammenfassend legt diese Studie den Schluss nahe, dass das RBP Whi3 ein zentraler Regulator des Zellwachstums und der Entwicklung ist, der in der Lage ist die Signalkapazität von Regulationsnetzwerke durch hinreichende Produktion diverser Schlüsselfaktoren zu gewährleisten.

SUMMARY

In *Saccharomyces cerevisiae* the RNA-binding protein Whi3 is involved in the regulation of diverse processes of cell growth and development. However, the Whi3-regulated effectors and signaling pathways remain largely unknown. Concerning cell size control, Whi3 has been proposed to inhibit the G1/S-transition through cytoplasmic retention of Cdc28-Cln3, but further hints suggest that Whi3 might govern this process by additional mechanisms. This study identified several yet unknown targets of Whi3 for the control of cell cycle progression and biofilm formation including the G1 cyclins Cln1/2 as well as three biofilm regulators, the PKA subunit Tpk1, the DYRK family kinase Yak1 and the transcription factor Tec1. This study provides evidence that Whi3 regulates the production of these factors through posttranscriptional control and might exert this function by affecting translational elongation. Interestingly, here, Whi3 has been linked for the first time to control of ploidy stability, because whi3-deficient strains exhibit a significant increase-in-ploidy phenotype that depends on environmental conditions. The data obtained in this study suggests that Whi3 might guarantee genome integrity by controlling the expression of several genes involved in sister chromatid cohesion and the dynactin complex component *NIP100* thereby ensuring faithful chromosome segregation. Finally, this study provides new insights into the Whi3-mediated stress response. The RBP is required for the stress-induced expression of the surface flocculin *FLO11* as well as for the general stress response and probably targets Yak1- and the stress transcription factors Msn2/4. Moreover, the deletion of *WHI3* seems to trigger a cellular transcriptional stress response by Yak1-independent mechanisms, which is reverted by whole genome duplication. In summary, this study suggests that the RBP Whi3 is a central regulator of cell growth and development, which is able to ensure appropriate signaling capacity of regulatory networks through sufficient supply of diverse key regulators.

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE

Die in dieser Arbeit verwendeten Maßeinheiten entsprechen dem Internationalen Einheitensystem (SI; „Système Internationale d’Unités“) und den davon abgeleiteten Einheiten. Ferner wurden Aminosäuren mit dem Drei-Buchstabencode der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ abgekürzt.

aa	Aminosäuren	ORF	offenes Leseraster
Abb.	Abbildung	P	Promotor
Ac	Acetat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Amp	Ampicillin	PAK	p21-aktivierte Kinase
APS	Ammoniumpersulfat	PAZ	PIWI/Argonaut/Zwille
aRNA	amplifizierte RNA	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
ATP	Adenosintriphosphat	PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
bp	Basenpaare	pH	„potentia Hydrogenii“
BSA	Bovines Serumalbumin	PI	Propidiumiodid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	PKA	Proteinkinase A
CCR region	„Cdc28-recruitment region“	„pre“-mRNA	„precursor“ mRNA
cDNA	komplementäre DNA	Proteinase	Protein-spaltendes Enzym
ChIP	Chromatin-Immopräzipitations-Analyse	PUF	Pumilio/FBF
CLIP	„Crosslinking Immopräzipitations-Analyse“	RBD	RNA-Bindedomäne
C-terminal	Carboxy-terminal	RBP	RNA-Bindeprotein
DIC	Differentialinterferenzkontrast	RF	Repräsentationsfaktor
DMSO	Dimethylsulfoxid	RFP	rot fluoreszierendes Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-phosphat	RNAse	Ribonuklease
Tri-			
DTT	Dithiothreitol	RRM	„RNA-recognition motif“
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“	rRNA	ribosomale RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	S	Svedberg (Einheit)
ER	Endoplasmatisches Retikulum	SC	„Synthetic Complete“
et al.	„und andere“	SOB	„Super Optimal Broth“
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“	STE	stabilisierendes Element
GFP	grün fluoreszierendes Protein	T	Terminator
GO	Genontologie	Tab.	Tabelle

GPI	Glykosylphosphatidyl-Anker	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
His	Histidin	TCA	Trichloressigsäure
IgG	Immunglobulin G	TCA-Zyklus	Citratzyklus
IRES	„internal ribosomal entry site“	TE	Tris-EDTA
KanMX4	Kanamycin-Resistenzgen	TF	Transkriptionsfaktor
kb	Kilobasenpaare	TIPI	„TEV-protease-mediated induction of protein instability“
KH	K-Homologie	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
LB	„Lysogeny Broth“	tRNA	Transfer-RNA
Leu	Leucin	Trp	Tryptophan
LFM	„Low fluorescence medium“	U	„Unit“
M	molar	Ura	Uracil
MAPK	mitogen aktivierbare Proteinkinase	UTR	„untranslated region“
MAT	„mating-type locus“	UV	ultraviolett
mRNA	„messenger“ RNA	v/v	„volume per volume“
mRNP	mRNA-Protein-Komplex	w/v	„weight per volume“
ncRNA	nicht-kodierende RNA	YNB	„Yeast Nitrogen Base“
NMD	„nonsense mediated decay“	YEPD	„Yeast Extract, Peptone, Dextrose“
N-terminal	Amino-terminal	YEPG	„Yeast Extract, Peptone, Galactose“
OD	optische Dichte	ZWI	Zellwandintegrität

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Die Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als eukaryotisches Modellsystem.....	1
1.2 Die pilzliche Adhäsion.....	4
1.2.1 Adhäsine aus opportunistisch pathogenen Pilzen und <i>S. cerevisiae</i>	4
1.2.2 Mechanismen zur Expressionskontrolle des Adhäsins <i>FLO11</i>	5
1.3 RNA-Bindeproteine (RBPs) und ihre diversen zellulären Funktionen.....	12
1.3.1 Familien von RNA-Bindedomänen (RBD)	13
1.3.2 Übersicht des mRNA-Metabolismus: vom Transkript zum Protein	15
1.3.3 Regulatorische Elemente von mRNAs	17
1.3.4 Mechanismen zur Regulation der mRNA-Stabilität durch RBPs	18
1.3.5 Mechanismen zur Regulation der Translationseffizienz durch RBPs	19
1.3.6 Mechanismen zur Regulation der mRNA-Lokalisation durch RBPs.....	20
1.3.7 Mechanismen zur Regulation von Signalnetzwerken durch RBPs	21
1.4 Das RNA-Bindeprotein Whi3	23
1.4.1 Regulation der Zellgröße durch Whi3	24
1.4.2 Regulation weiterer Prozesse durch Whi3	26
1.5 Ziele dieser Arbeit	28
2 Ergebnisse	29
2.1 Regulation der Biofilmbildung durch Whi3	29
2.1.1 Whi3 kontrolliert das adhäsive Wachstum über den <i>FLO11</i> -Promotor	29

2.1.2	Die Chromatinstrukturierer Ada2 und Hst3 sind potentielle Effektoren von Whi3 zur Regulation von <i>FLO11</i>	30
2.1.3	Die DYRK-Kinase Yak1 supprimiert den Adhäsionsdefekt von <i>WHI3</i> -defizienten Zellen und ist ein dosisabhängiger Regulator von <i>FLO11</i>	33
2.1.4	Whi3 kontrolliert die DYRK-Kinase Yak1 auf posttranskriptioneller Ebene ...	34
2.1.5	Whi3 und Yak1 koregulieren Gene der zellulären Hitzeantwort.....	35
2.1.6	Whi3 und Yak1 werden für die <i>FLO11</i> -Induktion unter Hitzestress und Glukosemangel benötigt	37
2.1.7	Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf Whi3 und Yak1	39
2.1.8	Whi3 kontrolliert zahlreiche Schlüsselregulatoren der Adhäsion auf posttranskriptioneller Ebene	41
2.1.9	Die Abwesenheit von <i>WHI3</i> verhindert die nukleäre Akkumulation der PKA-Untereinheit Tpk1	47
2.2	Regulation der Zellzyklusprogression durch Whi3.....	49
2.2.1	Whi3 reguliert mehrere G1-Cycline auf posttranskriptioneller Ebene	49
2.3	Potentielle Mechanismen der Whi3-vermittelten posttranskriptionellen Kontrolle..	51
2.3.1	Analyse der Whi3-abhängigen, regulatorischen Sequenzen.....	51
2.3.2	CLIP-Analyse zur Isolation Whi3-abhängiger regulatorischer Sequenzen	53
2.3.3	<i>WHI3</i> -defiziente Stämme weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber translationellen Inhibitoren auf.	55
2.4	Regulation der Ploidiestabilität durch Whi3	57
2.4.1	Whi3 wird für die Ploidiestabilität benötigt.....	57
2.4.2	Herstellung einer konditionalen <i>whi3Δ</i> -Mutante	61
2.4.3	Die Genomduplikation des haploiden <i>whi3Δ</i> -Stamms supprimiert weder die Defekte der Biofilmbildung noch der Zellgröße, führt jedoch scheinbar zur Ploidiestabilität.....	63
2.4.4	Whi3 wird ebenfalls posttranskriptionell in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen reguliert.	64

2.4.5	Whi3 kontrolliert die Expression der Dynaktinuntereinheit Nip100 auf posttranskriptioneller Ebene	66
2.4.6	Whi3 ist ein globaler Regulator von Genen des Zellzyklus, der Schwesterchromatidkohäsion und der Stressantwort	67
2.4.7	Die Genomduplikation des haploiden <i>whi3Δ</i> -Stamms erhöht geringfügig die Resistenz gegenüber Zellwandstress, nicht jedoch gegenüber Hitzestress oder translationellen Inhibitoren.....	72
3	Diskussion	74
3.1	Kontrolle der Zellgröße durch Whi3	74
3.2	Kontrolle der Ploidiestabilität durch Whi3	78
3.3	Kontrolle der Biofilmbildung durch Whi3	83
3.4	Regulation der Stressresistenz durch Whi3	88
3.5	Molekulare Mechanismen der Whi3-vermittelten posttranskriptionellen Kontrolle.....	91
3.6	Ausblick	93
4	Material	95
4.1	Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Kits und Sonstiges	95
4.1.1	Puffer und Lösungen	96
4.1.2	Nährmedien	101
4.1.3	Antibiotika und Antimykotika.....	102
4.1.4	Antikörper.....	103
4.1.5	Geräte und Programme.....	103
4.1.6	Bezugsquellen.....	106
4.2	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	107
4.2.1	Stämme	107
4.2.2	Plasmide	119
4.2.3	Oligonukleotide	123
5	Methoden.....	130
5.1	Kultivierung von Mikroorganismen	130

5.1.1	Kultivierung von <i>Escherischia coli</i>	130
5.1.2	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	130
5.2	Methoden zur Transformation und genomischen Manipulation	131
5.2.1	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	131
5.2.2	Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	132
5.2.3	Herstellung und Transformation von kompetenten <i>S. cerevisiae</i> Zellen	132
5.2.4	Generierung von genomischen Gendeletionen	133
5.2.5	Generierung von genomisch markierten Genen.....	134
5.3	Präparation von DNA	135
5.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit dem „Plasmid Mini-Kit“	135
5.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mittels alkalischer Lyse.....	135
5.3.3	Isolierung der Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> : „Smash & Grab“	136
5.4	Manipulation von DNA.....	136
5.4.1	Polymerase Kettenreaktion: PCR.....	136
5.4.2	Fällung von DNA.....	137
5.4.3	Restriktion von DNA	137
5.4.4	Dephosphorylierung und <i>in vitro</i> Ligation von DNA.....	138
5.4.5	<i>In vivo</i> Ligation von DNA in <i>S. cerevisiae</i>	138
5.4.6	Agarosegelelektrophorese	139
5.4.7	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	139
5.4.8	Herstellung von DIG- oder radioaktiv markierten DNA-Sonden für die Southern- bzw. Northern-Analyse	139
5.5	Analyse von DNA	140
5.5.1	Sequenzierung von DN	140
5.5.2	Nachweis von DNA: Southern Analyse.....	140
5.6	Analyse von RNA	141
5.6.1	Nachweis von RNA: Northern-Analyse	141

5.6.2	Globale Transkriptanalyse: „Microarray“	144
5.7	Analyse von Proteinen	146
5.7.1	Photometrischer β -Galaktosidase-Test	146
5.7.2	Nachweis von Proteinen: Western-Analyse	148
5.7.3	„Crosslinking Immunopräzipitations-Analyse“ von RBP-mRNA-Komplexen	150
5.8	Untersuchung von <i>S. cerevisiae</i>	152
5.8.1	Adhäsionstest an Agarplatten: Waschtest.....	152
5.8.2	Tropftest zur Bestimmung der Sensitivität von <i>S. cerevisiae</i> gegenüber verschiedenen Stressbedingungen	152
5.8.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	152
5.8.4	Bestimmung des Ploidiegehalts mittels „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS)	153
5.8.5	Bestimmung der Zellgröße	154
5.8.6	Bestimmung der Koloniegröße.....	155
5.8.7	Kreuzung von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	155
5.8.8	Bestimmung von Proteinhalbwertszeiten: „Cycloheximide Chase“	156
6	Literaturverzeichnis	158
	Erklärung	172
	Danksagung	173
	Lebenslauf	174

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Einleitung

Abb. 1:	Lebenszyklus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Abb. 2:	Signaltransduktionsnetzwerk zur Regulation des Adhäsins Flo11.	6
Abb. 3:	Schema des mRNA-Metabolismus und der Regulationspunkte durch RBPs.	16
Abb. 4:	Schema der wichtigsten regulatorischen und strukturellen Elemente einer mRNA zur Translationskontrolle durch RBPs.	18
Abb. 5:	Kombinatorische Kontrolle der <i>ASH1</i> -Expression durch verschiedene RBPs.	21
Abb. 6:	„Feed-Forward“-Inhibition der <i>FLO11</i> -Expression durch die RBPs Mpt5 und Khd1.	22
Abb. 7:	Domänenstruktur des RBPs Whi3.	24
Abb. 8:	Schema zur Regulation der G1/S-Transition durch Whi3.	25

Ergebnisse

Abb. 9:	Whi3 kontrolliert die Adhäsion und <i>FLO11</i> -Expression über den <i>FLO11</i> -Promotor.....	29
Abb. 10:	Die Histondeacetylasen Hst3 und Hst4 üben einen negativen Einfluss auf das adhäsive Wachstum aus und stellen potentielle Effektoren von Whi3 dar.	31
Abb. 11:	Die Histonacetylase-Untereinheit Ada2 ist in der Lage die <i>FLO11</i> -Expression in Anwesenheit von <i>WHI3</i> zu induzieren.....	31
Abb. 12:	Die Abwesenheit von <i>WHI3</i> verhindert die ektopische Überexpression von <i>ADA2</i>	32
Abb. 13:	Die DYRK-Kinase Yak1 ist ein dosisabhängiger Regulator von <i>FLO11</i> und supprimiert den Adhäsionsdefekt der <i>whi3Δ</i> -Mutante bei Überexpression.....	33
Abb. 14:	Whi3-vermittelte posttranskriptionelle Regulation von <i>YAK1</i>	34
Abb. 15:	Identifizierung von Whi3- bzw. Yak1-regulierten Genen mit Hilfe von genomweiten Transkriptanalysen.....	35
Abb. 16:	Whi3 und Yak1 sind für die <i>FLO11</i> -Induktion infolge von Hitzestress und Glukosemangel nötig.	38
Abb. 17:	Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die Expression und Lokalisation von Whi3.....	39
Abb. 18:	Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die Expression und Lokalisation von Yak1.	40

Abb. 19:	Bestimmung der Abhängigkeit des <i>GFP</i> -ORFs von <i>WHI3</i>	42
Abb. 20:	Funktionalitätsanalyse der <i>GFP</i> -markierten Regulatoren der Zelldifferenzierung mit Hilfe eines Adhäsionstests.	43
Abb. 21:	Posttranskriptioneller Einfluss von <i>WHI3</i> auf verschiedene Schlüsselregulatoren der Adhäsion und Zellentwicklung.....	44
Abb. 22:	Funktionalitätsanalyse der <i>GFP</i> -markierten Regulatoren der Zelldifferenzierung mit Hilfe eines Adhäsionstests.	45
Abb. 23:	Posttranskriptioneller Einfluss von <i>WHI3</i> auf verkürzte, <i>GFP</i> -markierte Versionen verschiedener Schlüsselregulatoren der Adhäsion und Zellentwicklung.	46
Abb. 24:	Die Deletion von <i>WHI3</i> verhindert die Akkumulation von Tpk1 im Kern.	48
Abb. 25:	Whi3 kontrolliert die G1-Cycline Cln1 und Cln2 auf posttranskriptioneller Basis.....	50
Abb. 26:	<i>WHI3</i> übt keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der <i>GFP</i> -markierten G1- Cycline Cln1 und Cln2 aus.	51
Abb. 27:	„Crosslinking Immunopräzipitations-Analyse“ (CLIP) zur Identifikation von Whi3-gebundenen mRNAs und Zielsequenzen <i>in vivo</i>	54
Abb. 28:	Whi3 wird für die Resistenz gegenüber translationellen Inhibitoren, nicht jedoch für die Proteinstabilität von Yak1 benötigt.....	56
Abb. 29:	Ploidieanalyse von <i>WHI3</i> - und <i>whi3Δ</i> -Stämmen mit <i>MIG2-GFP</i>	57
Abb. 30:	Whi3 wird für die Ploidiestabilität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen benötigt.	59
Abb. 31:	Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von <i>WHI3</i> , der Ploidie und den Wachstumsbedingungen.....	60
Abb. 32:	Generierung einer konditionalen <i>whi3Δ</i> -Mutante mit Hilfe des TIPI-Systems.....	62
Abb. 33:	Einfluss von <i>WHI3</i> und der Ploidie auf die Biofilmbildung, Zellgröße und Ploidiestabilität.	63
Abb. 34:	Whi3 unterliegt einer posttranskriptionellen Regulation in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen.	65
Abb. 35:	Whi3 kontrolliert <i>NIP100</i> , die Untereinheit des Dynaktinkomplexes, auf posttranskriptioneller Ebene in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen.....	67
Abb. 36:	Identifizierung von Whi3- und Ploidie-regulierten Genen mit Hilfe von globalen Transkriptanalysen.....	68
Abb. 37:	Die Deletion von <i>WHI3</i> führt zur erhöhten Expression von Genen der Schwesterchromatidkohäsion.	70

Abb. 38: Auswirkung der Ploidieerhöhung im <i>whi3Δ</i> -Hintergrund auf die Sensitivität gegenüber diversen Stressbedingungen.	72
--	----

Diskussion

Abb. 39: Modell zur Zellgrößenkontrolle in Abhängigkeit von <i>WHI3</i>	75
Abb. 40: Modell zur Regulation der Ploidiestabilität durch Whi3.	80
Abb. 41: Schaltschema zur Regulation der <i>FLO11</i> -Expression durch Whi3.	84
Abb. 42: Model zur dualen Regulation des cAMP-/PKA-Signalweges durch Whi3 unter Biofilm-induzierenden und -inhibierenden Bedingungen.....	87
Abb. 43: Model des Whi3-kontrollierten Signalnetzwerkes zur Regulation der Zellgröße, Ploidiestabilität, Biofilmbildung und Stressantwort.	93

1 EINLEITUNG

1.1 Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als eukaryotisches

Modellsystem

Die Wahrnehmung und Verarbeitung von äußeren Signalen wie z. B. Nährstoffen stellt eine lebenswichtige Fähigkeit aller Organismen dar, um sich wechselnden Umweltbedingungen anzupassen. Die darauf folgende zelluläre Differenzierung kann sich auf unterschiedlichste Ebenen wie z. B. den Metabolismus, die Größe, die Morphologie und die Polarität der einzelnen Zelle erstrecken. Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ebenfalls in der Lage in Abhängigkeit des vorherrschenden Nährstoffangebots koordinierte Änderungen der Zellphysiologie, Morphologie und Adhäsion vorzunehmen und eignet sich somit hervorragend als Modellorganismus, um zelluläre Differenzierung in Eukaryoten zu studieren (Palecek et al., 2002).

S. cerevisiae ist ein Hemiascomycet, der zusammen mit humanpathogenen Hefen wie *Candida albicans* und *Candida glabrata* zu der Ordnung der *Saccharomycetales* gezählt wird. Dabei entspricht die Bezeichnung „Hefe“ jedoch keinem phylogenetischen Taxon sondern beschreibt vielmehr eine sehr heterogene Gruppe von Pilzen, die alle in der Lage sind in Form einzelliger ovaler Thalli zu wachsen. Die Bäckerhefe wird bereits seit über 6000 Jahren für die Bier-, Wein- und Brotherstellung genutzt, da sie in der Lage ist, auch in Gegenwart von Sauerstoff, Zucker zu Ethanol und Kohlendioxid zu vergären (Fiechter et al., 1981; Cavalieri et al., 2003). Neben der Kultivierung durch den Menschen ist bisher jedoch nur wenig über die natürlichen Habitate und Verbreitungsmöglichkeiten dieses einzelligen, nicht-motilen Pilzes bekannt. Bisher konnten *S. cerevisiae* Isolate z. B. aus reifen Früchten und Eichenrinde gewonnen werden (Mrak and Phaff, 1948; Naumov et al., 1998). Des Weiteren könnten soziale Wespen eine mögliche Nische der Bäckerhefe darstellen, da *S. cerevisiae* Zellen in adulten Wespenköniginnen überwintern und anschließend an deren Nachkommen weitergegeben werden können (Stefanini and Dapporto, 2012). *S. cerevisiae* spielt zudem eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie als Modellorganismus für eukaryotische Zellen. Dies liegt v. a. in der einfachen Kultivierung, kurzen Generationszeit, leichten Zugänglichkeit und dem Vorhandensein diverser molekularer Techniken begründet.

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* kann sowohl in haploider als auch in diploider Form vorliegen, wobei die diploide Wachstumsform das bevorzugte Stadium in der Natur darstellt (Abb. 1).

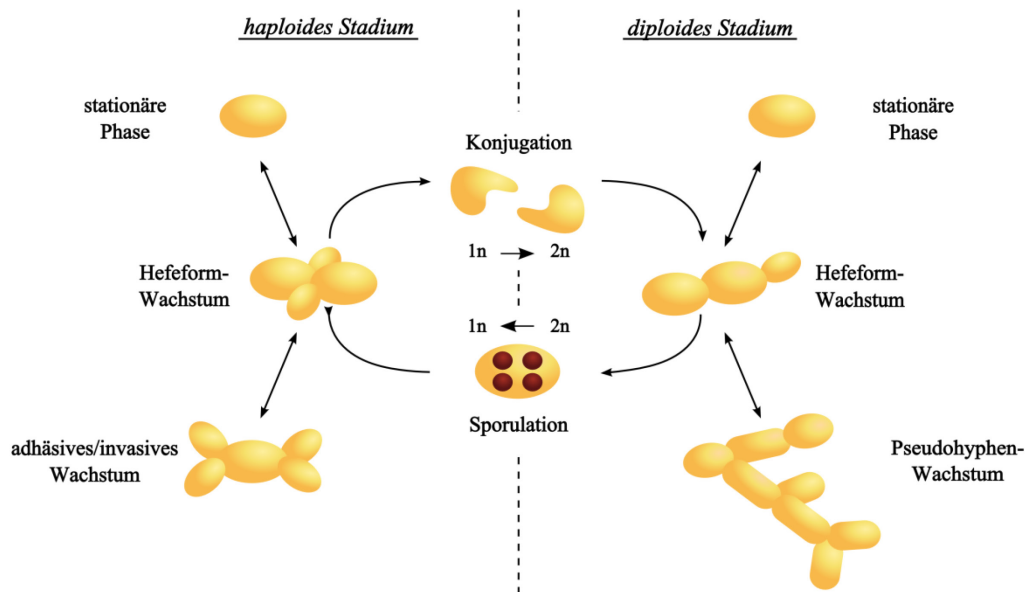


Abb. 1: Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Bäckerhefe kommt sowohl als haploide als auch diploide Zelle vor und kann sich vegetativ in der Hefeform vermehren. Im Rahmen der sexuellen Vermehrung fusionieren zwei haploide Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps miteinander (Konjugation) und bilden eine diploide Zygote aus, die wiederum durch Sporulation vier haploide Zellen hervorbringen kann. Gewisse Mangelbedingungen führen zur Ausbildung weiterer Differenzierungsformen. So arretieren sowohl haploide als auch diploide Zellen in Abwesenheit von verwertbaren Kohlenstoffquellen in der stationären G1-Phase, während der Mangel an Stickstoff in diploiden Zellen das Pseudohyphenwachstum einleitet. Ein ähnliches Phänomen tritt in haploiden Zellen z. B. nach Glukoselimitation auf und wird als adhäsives/invasives Wachstum bezeichnet.

Diese Tendenz liegt v. a. in der höheren genetischen Stabilität einer diploiden Zelle begründet, da potentiell auftretende Mutationen leicht an Hand des zweiten Genomsatzes repariert werden können. Die Vermehrung von *S. cerevisiae* erfolgt entweder vegetativ durch axiale Sprossung oder sexuell durch Karyo- und Plasmogamie zweier Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps (Konjugation). Die Bäckerhefe kann zwei Geschlechtstypen annehmen, *MATa* oder *MATα*. Dabei wechselt die Mutterzelle nach jeder erfolgten Teilung den Geschlechtstyp, was schließlich zur Ausbildung einer Mischpopulation von haploiden *MATa* und *MATα*- und diploiden *MATa/α*-Zellen führt (Haber, 2012). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von homothallischen Hefen. Im Gegensatz dazu sind die meisten Laborstämme heterothallisch, da sie aufgrund einer Mutation innerhalb der *HO*-Endonuklease nicht mehr zu einem Wechsel des Geschlechtstyps befähigt sind. Die sexuelle Vermehrung dient v. a. der genetischen Rekombination und Variation innerhalb einer Population.

Darüber hinaus ist die Bäckerhefe in der Lage in Abhängigkeit des Nährstoffangebots unterschiedliche Differenzierungsstadien anzunehmen, wobei v. a. die Verfügbarkeit von

Kohlenstoff und Stickstoff eine zentrale Rolle spielt (Abb. 1). So vermehren sich in Anwesenheit ausreichender Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowohl haploide als auch diploide Hefezellen durch Sprossung (Hefeform). Falls beide Zelltypen jedoch einem Mangel an verwertbaren Kohlenstoffquellen ausgesetzt sind, arretieren sie in der G1-Phase und wechseln in die stationäre Phase, um den Zeitraum des schlechten Nährstoffangebots zu überdauern (Hartwell, 1974). Ein zusätzlicher Stickstoffmangel in Anwesenheit von nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie z. B. Acetat führt dahingegen in diploiden Zellen zum Eintritt in die Meiose und zur Sporulation (Esposito and Klapholz, 1982). Dabei werden vier äußerst widerstandsfähige, haploide Sporen ausgebildet, die in der Lage sind lange Phasen schlechten Nährstoffangebots zu überstehen und unter verbesserten Umweltbedingungen erneut auszukeimen. In Folge von Stickstoffmangel und gleichzeitiger Anwesenheit von fermentierbaren Kohlenstoffquellen wechseln diploide *S. cerevisiae* Zellen von der einzelligen Hefeform in das mehrzellige, filamentöse Stadium (Gimeno and Fink, 1992; Kron et al., 1994). Diese auch als Pseudohyphen-Wachstum bezeichnete Differenzierungsform ist durch ein unipolares Sprossungsmuster am distalen Pol und eine Verlängerung der Zellen gekennzeichnet. Dabei lösen sich die einzelnen *S. cerevisiae* Zellen nach vollzogener Teilung nicht vollständig voneinander und tragen somit zur Ausbildung langer Ketten bei. Diese sogenannten Pseudohyphen sind ferner in der Lage am Substrat zu haften und dieses zu penetrieren. Eine ähnliche Wachstumsform kann auch in haploiden Hefezellen beobachtet werden, die z. B. in Folge von Glukosemangel einen Filament-ähnlichen Zellverband ausbilden (Kron et al., 1994; Cullen and Sprague, 2000). Bei dem haploiden adhäsiven/invasiven Wachstum verlängern sich die einzelnen Zellen jedoch nur leicht und weisen ein bipolares Sprossungsmuster auf, wobei sich Tochter- und Mutterzelle nach erfolgter Zellteilung ebenfalls nicht vollständig voneinander lösen. Des Weiteren ist auch dieser Biofilm in der Lage am Substrat zu haften und geringfügig das Substrat zu penetrieren. Zusammenfassend ist das filamentöse Wachstum in haploiden und diploiden Hefezellen durch eine Zunahme der Zelllänge, eine Reorganisation der Zellpolarität und eine erhöhte Zell-Zell- bzw. Zell-Substrat-Adhäsion gekennzeichnet. Dabei könnte die Fähigkeit zum filamentösen Wachstum es dem nicht-motilen Pilz ermöglichen neue Nährstoffquellen zu erschließen (Roberts and Fink, 1994).

1.2 Die pilzliche Adhäsion

Die Fähigkeit zur Adhäsion (Haftung) an biotische und abiotische Oberflächen ist ein wichtiges Charakteristikum diverser Pilze und ist sowohl im medizinischen als auch industriellen Rahmen von hoher Relevanz. Einige humanpathogene Pilze wie *C. glabrata* und *C. albicans* sind z. B. in der Lage arzneimittelresistente Biofilme auf medizinischen Ausrüstungen wie Kathetern oder Prothesen auszubilden (Brunke and Hube, 2012). Auf diese Weise können sie in den Körper von immunsupprimierten Personen eindringen und durch die Anhaftung an Epithelien systemische Infektionen hervorrufen. Ferner macht man sich die Fähigkeit von *S. cerevisiae* zur Flockenbildung v. a. innerhalb der Braukunst zu Nutze, wenn am Ende des Fermentationsprozesses die verwendeten *S. cerevisiae* Zellen aufgrund der erschöpften Kohlenstoffquelle aneinander haften und somit die leichte Abtrennung vom Fermentationsprodukt ermöglichen (Verstrepen et al., 2003). In all diesen Fällen wird die Adhäsion durch spezialisierte Oberflächenproteine, die Adhäsine, ermöglicht, welche die Zell-Zell- bzw. die Zell-Substrat-Adhäsion vermitteln (Verstrepen and Klis, 2006). Diese Oberflächenproteine bilden sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *C. albicans* und *C. glabrata* eine Superfamilie, deren Primärsequenz zum Teil sehr unterschiedlich sein kann, die jedoch alle eine gemeinsame Domänenstruktur aufweisen (Verstrepen et al., 2004). Dabei gliedern sich die Adhäsine grob in drei distinkte Domänen, die N-terminale A-Domäne zur Ligandenbindung von Proteinen oder Kohlenhydraten, die mittlere B-Domäne, die v. a. strukturgebende Funktionen erfüllt, und die C-terminale C-Domäne, welche einen GPI-Anker zur transienten Befestigung des Proteins in der Zellmembran enthält (Jentoft, 1990; Lu et al., 1995; Kobayashi et al., 1998; Groes et al., 2002; Veelders et al., 2010).

1.2.1 Adhäsine aus opportunistisch pathogenen Pilzen und *S. cerevisiae*

Die einzelnen Hefespezies besitzen meist eine hohe Zahl vegetativer Adhäsine, die aufgrund verschiedener Ligandenspezifitäten die Haftung an diverse Substrate und Wirtsepithelien ermöglichen und somit die Anpassung und Spezialisierung des Pilzes in unterschiedlichen Umgebungen oder Entwicklungszyklen erlauben. Dies spielt v. a. bei humanpathogenen Vertretern während der Infektion eine wichtige Rolle, da diese Pilze an unterschiedlichste Oberflächen adhärieren müssen, um ihren Wirt erfolgreich zu besiedeln. So kodiert der humanpathogene Candidiasis Erreger *C. albicans* u. a. für Hwp1 und acht Als- („agglutinin-like sequence“) Proteine, die vorrangig Endothel- und Epithelgewebe erkennen, sowie für Eap1, welches an der Bindung an Plastikoberflächen wie Kathetern oder Prothesen beteiligt

ist (Li and Palecek, 2003; Li et al., 2007). *C. glabrata* verfügt sogar über mindestens 23 unterschiedliche *EPA*- („epithelial cell wall protein“) Gene, über deren Expressionsmuster und Ligandenspezifität bisher jedoch nur wenig bekannt ist (Kaur et al., 2005; Zupancic et al., 2008; Maestre-Reyna et al., 2012).

Im Gegensatz zu *C. albicans* oder *C. glabrata* besitzt die Bäckerhefe *S. cerevisiae* lediglich fünf Adhäsiene, Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 und Flo11, die auch als Flokkuline bezeichnet werden (Teunissen and Steensma, 1995; Lambrechts et al., 1996; Lo and Dranginis, 1996). Unter Laborbedingungen sind die ersten vier Adhäsiene aufgrund ihrer Telomer-nahen Lokalisation (ca. 10 bis 40 kb vom Telomer entfernt) epigenetisch stillgelegt (Guo et al., 2000). Somit wird im Laborstamm Σ 1278b z. B. nur *FLO11* exprimiert, während S288C aufgrund einer sinnentstellten Mutation im Transkriptionsaktivator Flo8 keines der fünf Flokkuline exprimiert (Liu et al., 1996). Die nahe verwandten Adhäsiene Flo1, Flo5 und Flo9 gehören dem Flokkulationstyp I an und sind in der Lage Calcium-abhängig Mannose-Polymere auf anderen Zellen zu binden (Stratford and Assinder, 1991; Teunissen and Steensma, 1995). Aufgrund dessen werden sie zu den lektinähnlichen Adhäsinen gezählt. Im Gegensatz dazu ist der genaue Bindemechanismus von Flo10 und Flo11 noch weitestgehend unverstanden. Aktuelle Modellen zufolge könnte es sich eventuell um hydrophobe Wechselwirkungen mit Liganden bzw. Oberflächen handeln, da die Überexpression von *FLO11* z. B. die Hydrophobizität der Zelloberfläche erhöht (Guo et al., 2000; Kang and Choi, 2005; Van Mulders et al., 2009). Während die Adhäsiene des Flokkulationstyp I vorrangig die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln, sind Flo10 und Flo11 sowohl für die Zell-Zell- als auch die Zell-Substrat-Adhäsion an z. B. Plastik und die Biofilm- bzw. Pseudohyphenbildung verantwortlich (Lambrechts et al., 1996; Lo and Dranginis, 1996; Guo et al., 2000; Reynolds and Fink, 2001).

1.2.2 Mechanismen zur Expressionskontrolle des Adhäsiens *FLO11*

Im Allgemeinen werden Adhäsiene nicht konstitutiv exprimiert sondern unterliegen einer komplexen transkriptionellen Regulation, um diverse Umweltsignale wie das Nährstoffangebot und physikalische Reize (festes oder flüssiges Substrat) zu integrieren. Da die meisten Pilze über ein großes Repertoire an Adhäsinen verfügen, wurden die Regulationsmechanismen zur Biofilmbildung hauptsächlich im *S. cerevisiae* Laborstamm Σ 1278b untersucht, der aufgrund der transkriptionellen Stilllegung von *FLO1*, *FLO5*, *FLO9* und *FLO10* lediglich das Flokkulin *FLO11* exprimiert (Guo et al., 2000). Das *FLO11*-Gen

verfügt mit ca. 2,8 kb über einen außergewöhnlich großen Promotor im Vergleich zum restlichen Hefegenom, deren Promotoren eine durchschnittliche Größe von 300 bp aufweisen (Dujon, 1996; Rupp et al., 1999). Diese enorme Promotorengröße spiegelt sich in der äußerst vielfältigen Regulation von *FLO11* wieder, das sowohl auf transkriptioneller Ebene durch diverse Signalkaskaden als auch auf epigenetischer und translationeller Basis kontrolliert wird. Zu den bedeutendsten und z. T. stark konservierten Signaltransduktionskaskaden gehören die Kss1-/MAPK-Kaskade, der cAMP-/PKA-Signalweg, der Snf1-/Glukose-Repressionssignalweg und der Generelle Aminosäurekontrollweg (Abb. 2).

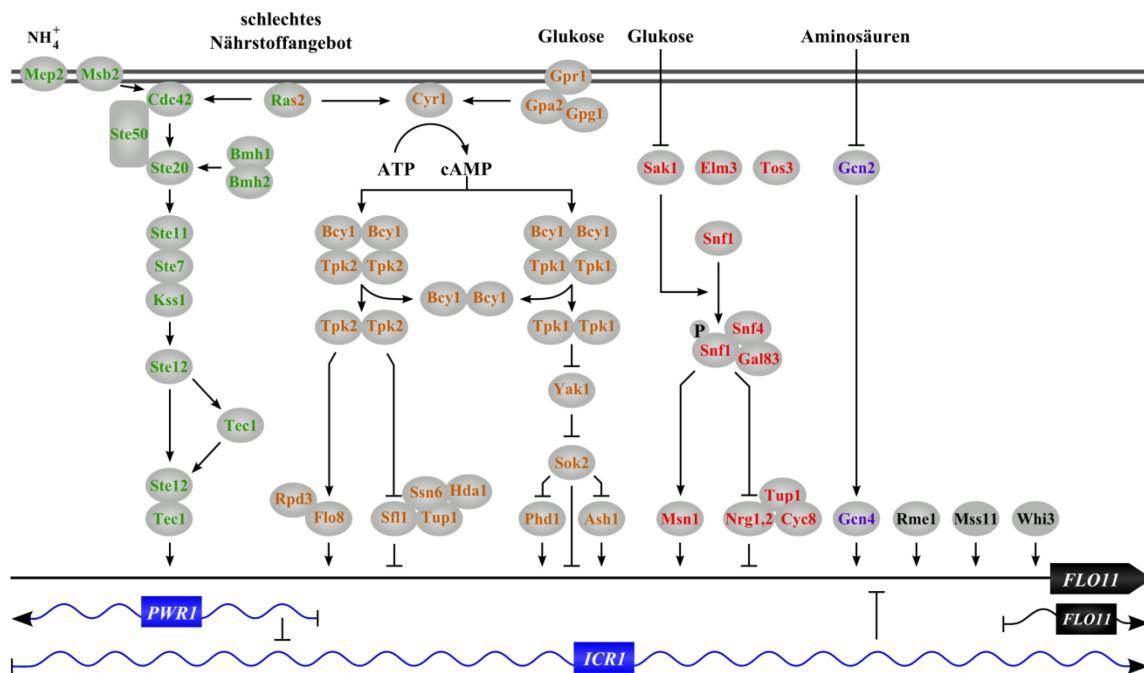


Abb. 2: Signaltransduktionsnetzwerk zur Regulation des Adhäsins Flo11.

Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege und Einzelfaktoren zur Expressionskontrolle des *FLO11*-Gens in Abhängigkeit verschiedenster Umweltbedingungen sofern bekannt (nähere Erläuterungen siehe Text). Die einzelnen Signalwege sind farblich markiert und umfassen die Kss1-/MAPK-Kaskade (grün), den cAMP-/PKA-Signalweg (orange), den Snf1-/Glukoserepressionssignalweg (rot) sowie den Generellen Aminosäurekontrollweg (violett). *FLO11* wird außerdem durch zwei nicht-kodierende (nc) RNAs (blau), *PWR1* und *ICRI*, reguliert. Die Lage der Bindestellen von Transkriptionsfaktoren und die Längen der ncRNAs sind lediglich schematisch dargestellt.

1.2.2.1 Die Kss1-/MAPK-Kaskade

Die mitogen aktivierbare Proteinkinase- (MAPK) Kaskade ist ein in allen Eukaryoten hochkonservierter Signaltransduktionsweg mit den Hauptkomponenten Ste20 (PAK), Ste11 (MAPKKK) und Ste7 (MAPKK), welche nicht nur an der Kss1-/MAPK-Kaskade zur Ausbildung von Biofilmen beteiligt sind, sondern ebenfalls in den Kreuzungs- und den

Hochosmolaritäts-Glycerol- (HOG) Weg involviert sind (Liu et al., 1993; Verstrepen and Klis, 2006). Trotz der gemeinsamen Elemente wird die Spezifität der jeweiligen Signalwege durch vor- und nachgeschaltete Komponenten bestimmt. Die Aktivierung der Kss1-/MAPK-Kaskade kann einerseits durch das GTP-bindende Protein Ras2 oder das Signalmucin Msb2 erfolgen (Mösch et al., 1996; Cullen et al., 2004). Msb2 ist ein integratives Membranprotein, das in Analogie zu Mechanorezeptoren eventuell Zellwandänderungen wahrnehmen könnte, die beim Kontakt mit festen Oberflächen auftreten. Des Weiteren kann die Kss1-/MAPK-Kaskade in Folge von Stickstofflimitierung durch die Ammonium-Permease Mep2 induziert werden (Lorenz et al., 2000; Rutherford et al., 2008). Auch Fuselalkohole, die als Nebenprodukt während der Aminosäurebiosynthese unter Stickstoffmangel entstehen, könnten als Signalmoleküle dienen, um die Biofilmbildung über die Kss1-/MAPK-Kaskade zu induzieren. Während sowohl Ras2 als auch Msb2 die kleine Rho-ähnliche GTPase Cdc42 aktivieren, sind die Interaktionspartner von Mep2 bzw. Fuselalkoholen zur Signalweiterleitung noch weitestgehend unbekannt (Mösch et al., 1996; Cullen et al., 2004). Cdc42 interagiert mit Hilfe des Gerüstproteins Ste50 mit der PAK (p21-aktivierte Kinase) Ste20 und aktiviert diese in Abhängigkeit von den beiden 14-3-3 Proteinen Bmh1 und Bmh2, (Roberts et al., 1997). Ste20 wiederum initiiert die sequentielle Phosphorylierung von Ste11, Ste7 und Kss1 (Liu et al., 1993; Roberts and Fink, 1994). Während unphosphoryliertes Kss1 zusammen mit den Repressoren Dig1 und Dig2 einen inhibitorischen Komplex mit dem Transkriptionsaktivator Ste12 bilden, führt die Phosphorylierung von Kss1 durch Ste7 zur Freilassung von Ste12 aus dieser Assoziation (Cook et al., 1996; Bardwell et al., 1998). Anschließend induziert Ste12 die Expression eines weiteren Transkriptionsfaktors Tec1, der zur Familie der TEAD-Faktoren gehört und zur vollständigen Ausbildung des adhäsiven Wachstums benötigt wird (Mösch and Fink, 1997; Gavrias and Andrianopoulos, 2006). Tec1 ist nun in der Lage sowohl in kooperativer Weise mit Ste12 als auch Ste12-unabhängig die Expression von Zielgenen wie z. B. *FLO11* zu induzieren, um die Biofilmbildung zu ermöglichen (Madhani and Fink, 1997; Heise et al., 2010). Darüber hinaus ist Kss1 in der Lage Ste7 zu phosphorylieren (Prinz et al., 2007). Obwohl die genaue Funktion dieser Modifikation durch Kss1 nicht bekannt ist, könnte es sich um eine positive „Feedback“-Schleife handeln.

1.2.2.2 Der cAMP-/PKA-Signalweg

Der cAMP-/PKA-Signalweg ist an der Wahrnehmung der Glukose- und Saccharose-verfügbarkeit beteiligt und kontrolliert diverse zelluläre Programme wie das Zellwachstum,

den Glukosemetabolismus, die generelle Stressantwort, die Flokkulation und das filamentöse Wachstum (Gagiano et al., 2002). Die Aktivierung dieses Signalweges kann zum einen durch das GTP-bindende Protein Ras2, das ebenfalls die Kss1-/MAPK-Kaskade induziert, oder über ein G-Protein-gekoppeltes Rezeptorsystem erfolgen, das u. a. aus dem Transmembranrezeptor Gpr1, dem $G\alpha$ -Protein Gpa2 und der $G\gamma$ -Untereinheit Gpg1 besteht (Rolland et al. 2000; Harashima and Heitman 2002; Lemaire et al. 2004). Bei der dazugehörigen β -Untereinheit könnte es sich um Gpb1/Gpb2 oder Asc1 handeln (Harashima and Heitman, 2002; Zeller et al., 2007). Des Weiteren kann der cAMP-/PKA-Signalweg durch die intrazelluläre Phosphorylierung von Glukose induziert werden (Rolland et al., 2001). Die hier vorgestellten Aktivierungsmöglichkeiten des cAMP-/PKA-Signalweges fördern schließlich die Produktivität der Membran-assoziierten Adenylatzyklase Cyr1 und resultieren somit in erhöhten intrazellulären cAMP-Mengen (Kataoka et al., 1985). Dieser sekundäre Botenstoff ist in der Lage die hochkonservierte und zentrale Proteinkinase A (PKA) zu aktivieren, einem Dimer aus der inhibitorischen Untereinheit Bcy1 und einer der drei katalytischen Untereinheiten Tpk1, Tpk2 oder Tpk3. Dazu bindet cAMP an das Bcy1-Dimer und ermöglicht dessen Dissoziation vom katalytischen Teil, der daraufhin durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren Zielprogramme steuern kann (Toda et al., 1987a, 1987b). Dabei übernehmen die einzelnen katalytischen Untereinheiten trotz ihrer Redundanz im Rahmen der Viabilität verschiedene Rollen während des filamentösen Wachstums. So übt Tpk2 einen positiven Einfluss auf die Expression des Oberflächenflokkulins *FLO11* aus, indem es den Transkriptionsaktivator Flo8 aktiviert und den Transkriptionsrepressor Sfl1 inhibiert (Robertson and Fink, 1998; Pan and Heitman, 2000; Conlan and Tzamaras, 2001). Im Gegensatz dazu wirken Tpk1 und Tpk3 aufgrund einer „Feedback“-Inhibition negativ auf das filamentöse Wachstum (Robertson and Fink, 1998; Pan and Heitman, 1999). Ferner inhibiert Tpk1 die DYRK-Kinase Yak1, was schließlich in der Aktivierung des Transkriptionsrepressor Sok2 resultiert (Malcher et al., 2011). Sok2 wiederum ist in der Lage die *FLO11*-Expression sowohl direkt durch Bindung des *FLO11*-Promotors als auch indirekt durch Inhibierung zweier Transkriptionsaktivatoren, Phd1 und Ash1, zu reprimieren (Gimeno and Fink, 1994; Ward et al., 1995; Pan and Heitman, 2000). Zusammenfassend übernehmen Tpk1 und Tpk2 gegensätzliche Funktionen während der Regulation der *FLO11*-Expression. Es wird spekuliert, dass diese duale Schaltung die *FLO11*-Expression sowohl unter hoher PKA-Aktivität über den Tpk2-Flo8-Zweig als auch unter niedriger PKA-Aktivität durch Inhibierung des Tpk1-Sok2-Zweiges gewährleistet (Malcher et al., 2011). Obwohl der cAMP-/PKA-Signalweg bisher in diversen Studien untersucht wurde, bleiben einige

Kontroversen bestehen. So wird das filamentöse Wachstums zwar sowohl durch Glukoselimitation als auch hohe PKA-Aktivität aktiviert, auf der anderen Seite wird der cAMP-/PKA-Signalweg jedoch durch hohe und nicht niedrige Glukosemengen stimuliert. Eine mögliche Erklärung dieser kontroversen Daten könnte in unterschiedlichen Stammhintergründen begründet liegen, die es manchen Stämmen ermöglichen eine hohe PKA-Aktivität trotz geringer Glukoseverfügbarkeit beizubehalten (Granek et al., 2013). Diese Hypothese bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

1.2.2.3 Der Snf1-/Glukose-Repressionssignalweg

Die Glukoseverfügbarkeit wird neben dem cAMP-/PKA-Signalweg ebenfalls über den Snf1-/Glukose-Repressionssignalweg weitergeleitet, um die Expression des Oberflächenflokkuins *FLO11* zu regulieren. Der zentrale Snf1-Komplex setzt sich aus der Serin-Threonin-Kinase Snf1, die als katalytischer Teil fungiert, der regulatorischen γ -Untereinheit Snf4 und einer der drei β -Untereinheiten Gal83, Sip1 oder Sip2 zusammen (Yang et al., 1994; Jiang and Carlson, 1997). Dabei scheint v. a. Gal83 für die *FLO11*-Kontrolle verantwortlich zu sein (Vyas and Kuchin, 2003). In Anwesenheit von fermentierbaren Kohlenstoffquellen dephosphoryliert der Reg1-/Glc7-Phosphatase-Komplex die zentrale Kinase Snf1 und inaktiviert sie somit (Hedbacker and Carlson, 2008). Dies ermöglicht den transkriptionellen Repressoren Nrg1 und Nrg2 an den *FLO11*-Promotor zu binden und weitere Repressoren wie Tup1 und Cyc8 zu rekrutieren, um die Expression von *FLO11* zu verhindern (Kuchin et al., 2002). Dahingegen wird Snf1 unter niedrigen Glukosebedingungen durch eine der drei Kinasen Elm1, Sak1 oder Tos3 phosphoryliert und aktiviert (Hong et al., 2003). Des Weiteren bindet die regulatorische γ -Untereinheit Snf4 an Snf1 und unterdrückt auf diese Weise die Autoinhibition von Snf1 (Jiang and Carlson, 1996). In Folge dessen inhibiert Snf1 auf bisher noch unbekannte Weise die beiden Transkriptionsrepressoren Nrg1 und Nrg2, um die Derepression von *FLO11* zu ermöglichen.

1.2.2.4 Der Generelle Aminosäurekontrollweg

Neben Glukose- oder Stickstofflimitation führt auch der Mangel von ein oder mehreren Aminosäuren zur Induktion von *FLO11* und zur Ausbildung des filamentösen Wachstums (Braus et al., 2003). Der zu Grunde liegende Signalweg setzt sich hauptsächlich aus der Sensorkinase Gcn2 und dem Transkriptionsfaktor Gcn4 zusammen (Hinnebusch, 2005). Dabei kommt es in Folge von Aminosäurelimitation zu einem Anstieg ungeladener tRNAs innerhalb der Zelle, die durch die Sensorkinase Gcn2 wahrgenommen werden (Wek et al.,

1989). Daraufhin phosphoryliert Gcn2 den Translationsinitiationsfaktor eIF2 und führt somit zur Verringerung der generellen Translationseffizienz (Dever et al., 1992). Nur bestimmte mRNAs wie z. B. die des Transkriptionsfaktors Gcn4 werden bevorzugt translatiert. Schließlich ermöglicht Gcn4 wahrscheinlich indirekt die Derepression von *FLO11* (Braus et al., 2003; Valerius et al., 2007).

1.2.2.5 Weitere *FLO11*-Regulatoren

Neben den oben vorgestellten Hauptsignaltransduktionskaskaden zur Regulation des filamentösen Wachstums existieren weitere Faktoren, welche in der Lage sind die *FLO11*-Expression zu kontrollieren. Diese Faktoren umfassen u. a. Transkriptionsregulatoren sowie Chromatinumstrukturierer und wurden dadurch identifiziert, dass ihre Deletion bzw. Überexpression eine veränderte *FLO11*-Expression hervorruft. So konnte der Transkriptionsfaktor Msn1 als positiver *FLO11*-Regulator identifiziert werden. Da Msn1 in der Lage ist die Adhäsionsdefekte einer *snf1Δ*-Mutante zu supprimieren, könnte er innerhalb des Snf1-/Glukoserepressionsweges fungieren (Estruch and Carlson, 1990). Darüber hinaus wird jedoch auch über eine Involvierung von Msn1 in der Chromatinumstrukturierung spekuliert (Sidorova and Breeden, 1999).

Ein weiteres Beispiel eines potentiellen Chromatinumstrukturierers stellt der Transkriptionsfaktor Rme1 dar, der u. a. den Übertritt in die Meiose inhibiert und auch die Adhäsion v. a. in haploiden Zellen positiv beeinflusst (Van Dyk et al., 2003). Da Rme1 unabhängig von anderen bekannten *Flo11*-Regulatoren wie Mss11, Msn1, Tec1, Ste12, Flo8, Sfl1, Sok2, Nrg1 oder Nrg2 zu fungieren scheint, wird über eine Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie oder der Chromatinumstrukturierung spekuliert.

Darüber hinaus nimmt der Transkriptionsfaktor Mss11 eine sehr zentrale Position innerhalb des regulatorischen Netzwerkes zur *FLO11*-Kontrolle ein (Van Dyk et al., 2005). So konnten Epistasisanalysen zeigen, dass Mss11 sowohl für die *FLO11*-Induktion über den cAMP-/PKA-Signalweg und die Kss1-/MAPK-Kaskade als auch für die *FLO11*-Derepression im *sfl1Δ*-, *nrg1Δ*-, *nrg2Δ*- bzw. *sok2Δ*-Hintergrund benötigt wird. Diese außergewöhnliche Position von Mss11 deutet auf eine essentielle Verbindung zur transkriptionellen Maschinerie hin. Allerdings konnte der genaue Mechanismus bisher noch nicht aufgeklärt werden.

1.2.2.6 Epigenetische Regulationsmechanismen

Neben den oben beschriebenen regulatorischen Netzwerken scheint die *FLO11*-Expression auch epigenetischen Kontrollmechanismen zu unterliegen. Diese Hypothese erwuchs v. a. aus

der Beobachtung, dass eine isogene, diploide *S. cerevisiae* Population in Folge von Stickstoffmangel eine relativ starke Zell-zu-Zell-Variation bezüglich der *FLO11*-Expression aufweist (Halme et al., 2004). Diese epigenetische Regulation weist eine hohe Promotorspezifität auf, die von der Lokalisation innerhalb des Genoms abhängig ist und über mindestens 10 Generationen an die Tochterzelle vererbt werden kann. Ermöglicht wird diese Kontrolle v. a. durch Chromatinstrukturierer, welche die Transkriptionseffizienz bestimmter Gene über den Acetyierungsgrad der Histone regulieren können und nach aktuellen Modellen die Klasse II und I Histondeacetylase Komplexe (HDAC) sowie den SWI/SNF-Komplex umfassen.

Im ersten Fall rekrutiert der Transkriptionsrepressor Sfl1, der als Effektor des cAMP-/PKA-Signalweges zur transkriptionellen Stilllegung von *FLO11* beiträgt, zunächst den generellen Tup1-/Ssn6-Repressorkomplex (Conlan and Tzamarias, 2001). Dieser Komplex interagiert wiederum mit der Klasse II HDAC Untereinheit Hda1 und könnte auf diese Weise die Chromatinkondensation am *FLO11*-Promotor durch den Klasse II HDAC ermöglichen (Wu et al., 2001; Halme et al., 2004).

Der zweite Mechanismus involviert die katalytische Untereinheit des Klasse I HDAC, Rpd3, die entgegen den Erwartungen einen positiven Einfluss auf die *FLO11*-Expression ausübt (Barrales et al., 2008; Bumgarner et al., 2009). Dies wird v. a. dadurch erreicht, dass die Chromatinkondensation am *FLO11*-Promotor nicht zu einer generellen transkriptionellen Stilllegung des Gens führt, sondern stattdessen die Bindestelle für den Transkriptionsrepressor Sfl1 blockiert und für den transkriptionellen Aktivator Flo8 offen legt (Bumgarner et al., 2009). Darüber hinaus ermöglicht dieser Kondensationszustand die Expression einer nicht-kodierenden (nc) RNA, *PWR1*, die im oberen Teil des *FLO11*-Promotors beginnt und gegenläufig zum *FLO11*-ORF verläuft. Die *PWR1* ncRNA übt einen positiven Einfluss auf die *FLO11*-Transkription aus, indem sie die Expression einer weiteren, reprimierenden ncRNA, *ICR1*, inhibiert. Da die *ICR1*-ncRNA weite Teile des *FLO11*-Promotors und -ORFs umspannt, ist sie in der Lage die *FLO11*-Expression in *cis* durch Promotor-Okklusion zu verhindern. Die *ICR1*-Expression wird ferner durch Sfl1 begünstigt. Mit Hilfe dieses Regulationsmechanismus ist *S. cerevisiae* in der Lage die *FLO11*-Expression schnell und effizient an- und auszuschalten.

Des Weiteren konnte eine aktivierende Funktion des SWI/SNF-Komplexes während der Regulation der *FLO11*-Expression beobachtet werden (Barrales et al., 2008). Dieser DNA-abhängige ATPase-Komplex reguliert die Transkription von Zielgenen ebenfalls durch Änderung der Chromatinstruktur (Peterson and Workman, 2000).

1.2.2.7 Translationelle Regulationsmechanismen

Darüber hinaus deuten einige Studien auf eine zusätzliche translationelle Regulation von *FLO11* hin. So zeigt die gleichzeitige Expression von *P_{FLO11}-FLO11* und dem Reporterkonstrukt *P_{FLO11}-LACZ* unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen, dass die mRNA-Mengen beider Konstrukte zwar vergleichbar sind, das Flo11-Protein jedoch in Abhängigkeit von Rps26, einem ribosomalen Protein der 40S Untereinheit, verhältnismäßig effizienter produziert wird (Strittmatter et al., 2006; Fischer et al., 2008). Des Weiteren übt das RNA-Bindeprotein (RBP) Khd1 durch direkte Bindung an Tandem-Wiederholungen innerhalb der *FLO11*-mRNA eine translationelle Repression von *FLO11* auf bisher unbekannte Weise aus (Wolf et al., 2010).

Ein weiteres RBP zur Regulation des filamentösen Wachstums ist Whi3, das erstmals in einer globalen Transposonmutagenese identifiziert wurde (Mösch and Fink, 1997). Dabei führt die Deletion von *WHI3* zu gravierenden Defiziten in der Zellverlängerung, Agarinvasion und Bildung von Filamenten. Wie genau Whi3 diese Funktion ausübt, d. h. durch direkte oder indirekte Aktivierung der *FLO11*-Expression, und welche Effektoren für diese Kontrolle von Nöten sind, ist bisher noch unverstanden und bedarf genauerer Untersuchungen. Neben dem filamentösen Wachstum scheint das RBP Whi3 in die Regulation diverser anderer zellulärer Prozesse wie den Zellzyklus, die Meiose und Sporulation, das apikale Wachstum von Knospen sowie die Zellwandintegrität involviert zu sein (Garí et al., 2001; Nash et al., 2001; Colomina et al., 2009; Ragni et al., 2011). Aufgrund dieser breiten Einflussnahme könnte Whi3 eine wichtigere Rolle innerhalb des gesamten zellulären Netzwerkes spielen. In Übereinstimmung damit zeigen einige Studien, dass RBPs wichtige regulatorische Funktionen übernehmen können, um ganze Signalwege bzw. Programme zu steuern (Prinz et al., 2007; Wolf et al., 2010).

1.3 RNA-Bindeproteine (RBPs) und ihre diversen zellulären Funktionen

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* kodiert für ca. 6300 Gene, von denen rund 5 bis 8% als RBPs identifiziert wurden (Glisovic et al., 2008). RBPs sind in allen essentiellen Prozessen der Zelle beteiligt und in der Lage durch differentielle Regulation von Transkripten Proteinmengen sowie deren Lokalisation zu kontrollieren. RBPs verfügen über spezialisierte Domänen, sogenannte RNA-Bindedomänen (RBD), mit Hilfe derer sie bestimmte Sequenzen oder Strukturen innerhalb von mRNA-Molekülen spezifisch erkennen und binden können.

Diese zum Teil konservierten, zum Teil degenerierten Motive sind häufig in den untranslatierten Bereichen (UTRs = „untranslated regions“) und in selteneren Fällen in der kodierenden Region zu finden (Shepard et al., 2003). Bis dato ist eine Vielzahl von RBDs bekannt, deren wichtigste Vertreter im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

1.3.1 Familien von RNA-Bindedomänen (RBD)

Bei den am weitesten verbreiteten RBDs handelt sich um das „RNA-recognition motif“ (RRM), das K-Homologie- (KH-) Motiv, das Pumilio/FBF- (PUF-) Motiv, die DEAD/DEAH-Box, die RGG-Box und die Piwi/Argonaut/Zwille- (PAZ-) Domäne.

Das „RNA-recognition motif“ (RRM)

Das RRM ist die am besten untersuchte RBD und in allen drei Reichen des Lebens vertreten. Die 90 bis 100 Aminosäure (aa) große Domäne setzt sich aus einem Oktamer (RNP1) und einem Hexamer (RNP2) mit konservierter Aminosäuresequenz zusammen, die von anderen, meist hydrophoben Aminosäuren umgeben sind (Maris et al., 2005). Die Sekundärstruktur der RRM wird aus vier antiparallelen β -Faltblättern sowie zwei α -Helices gebildet und ist in der Lage mit Hilfe von geladenen, aromatischen Aminosäuren vier Nukleotide auf der Ziel-RNA spezifisch zu binden. In der Regel enthalten typische RBPs mehrere Kopien der RRM-Domäne. In manchen Fällen können einzeln vorkommende RRM auch die Interaktion mit Proteinen vermitteln. RRM-enhaltene RBPs sind in alle zellulären Prozesse des RNA-Metabolismus involviert wie z. B. in die mRNA-Stabilität und Translationskontrolle über das Poly(A)-bindende Protein Pab1, sowie in das Splicing über Prp8 (Caponigro and Parker, 1995; Tarun and Sachs, 1995; Grainger and Beggs, 2005).

Das K-Homologie- (KH-) Motiv

Ähnlich dem RRM ist auch das KH-Motiv in allen drei Reichen des Lebens weit verbreitet und gut untersucht. Der RNA-bindende Teil setzt sich aus ca. 70 aa mit der funktionell wichtigen Sequenz (I/L/V)IGXXGXX(I/L/V) nahe des Domänenzentrums zusammen und formiert sich zu drei β -Faltblättern sowie zwei α -Helices (Lunde et al., 2007). Pro RBP können bis zu 15 KH-Domänen vorhanden sein, die in der Lage sind neben ssRNA auch ssDNA zu binden (Backe et al., 2005). Im Gegensatz zum RRM wird die Bindung von Nukleinsäuren jedoch nicht über aromatische Aminosäuren sondern über Wasserstoffbrücken und elektrostatische Interaktionen erreicht (Lunde et al., 2007). Ein wichtiger Vertreter in *S. cerevisiae* ist Scp160, ein essentielles RBP mit 14 KH-Domänen, das mit translatierenden

Ribosomen interagiert und u. a. als Effektor des Kreuzungssignalweges fungiert (Lang and Fridovich-Keil, 2000; Guo et al., 2003).

Das Pumilio/FBF- (PUF-) Motiv

PUF-Domänen enthaltene Proteine kommen in fast allen Eukaryoten vor. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* besitzt sechs PUF-Proteine, von denen fünf eine konservierte Struktur aufweisen (Quenault et al., 2011). Das PUF- oder auch Pum-HD genannte RBD ist durch eine charakteristische Bogen-artige Struktur gekennzeichnet, die aus acht helikalen Wiederholungen besteht. Mit der konkaven Seite wird die Bindung der RNA erreicht, während die äußere Seite für die Interaktion mit Proteinpartnern genutzt wird. PUF-RBPs üben meist einen negativen Einfluss auf ihre Ziel-mRNAs aus, indem sie bestimmte Sequenzen in der 3'-UTR binden und die Stabilität oder Translationseffizienz des Transkriptes senken. So reprimiert Mpt5 (Puf5) z. B. die Translation der *TEC1*-mRNA im Rahmen des adhäsiven Wachstums und Puf6 die Translation der *ASH1*-mRNA, die für einen Transkriptionsaktivator während des Kreuzungstypwechsels kodiert (Prinz et al., 2007; Deng et al., 2008). Darüber hinaus konnten neuere Studien in anderen Organismen vereinzelte aktivierende Einflüsse von PUF-RBPs auf die Translation bestimmter mRNAs beobachten (Kaye et al., 2009; Suh et al., 2009).

Die DEAD/DEAH-Box

DEAD/DEAH-Box Proteine verfügen meist über eine hoch-konservierte Helikase-Kerndomäne, mit deren Hilfe sie sowohl ATP als auch RNA binden können (Linder et al., 1989; Linder and Jankowsky, 2011). Die DEAD/DEAH-Box nimmt eine Klammer-artige Struktur an und besteht aus mindestens 12 charakteristischen Sequenzmotiven an konservierten Stellen, wobei Motiv II die namensgebende Sequenz Asp-Glu-Ala-Asp enthält. Innerhalb der Klammergrube wird die ATP-Bindung ermöglicht, gegenüber die Interaktion mit der RNA. Dabei werden ca. fünf Nukleotide über das Zucker-Phosphat-Rückgrat erkannt. DEAD/DEAH-Box Proteine sind ebenfalls in diverse biologische Prozesse wie die Ribosomenbiogenese, das pre-mRNA-Splicing, den mRNA-Export, die Translation sowie den RNA-Abbau involviert. Des Weiteren konnten sie auch als RNA-Chaperone in z. B. Mitochondrien identifiziert werden (Mohr et al., 2006; Bhaskaran and Russell, 2007). Gut untersuchte Beispiele umfassen die Translationsinitiationsfaktoren eIF4A und Ded1, die v. a. an der Translationsinitiation und speziell am „Scanning“ der mRNA durch den Präinitiationskomplex beteiligt sind (Blum et al., 1989; Iost et al., 1999).

Die RGG-Box

Die RGG-Box umfasst ca. 20 bis 25 aa und setzt sich v. a. aus Wiederholungen der namensgebenden Arg-Gly-Gly-Sequenz zusammen, die durch kurze, meist aromatische Aminosäuren unterbrochen sind (Kiledjian and Dreyfuss, 1992; Burd and Dreyfuss, 1994). Wahrscheinlich bildet die RGG-Box eine helikale β -Spiralstruktur aus, mit deren Hilfe sowohl RNA als auch ssDNA gebunden werden kann (Burd and Dreyfuss, 1994). RGG-Boxen kommen meist in Verbund mit anderen RBDs vor und dienen wahrscheinlich vorrangig der Verbesserung der allgemeinen Protein-RNA-Interaktion (Ghisolfi et al., 1992). Beispiele RGG-Box-enthaltener RBPs stellen der essentielle Transkriptionsinitiationsfaktor Ded1 sowie Scd6 dar. Letzterer bindet mit Hilfe seiner RGG-Box den Translationsinitiationsfaktor eIF4G und inhibiert auf diese Weise die Translation (Rajyaguru et al., 2012).

Die PIWI/Argonaut/Zwille- (PAZ-) Domäne

Diese ca. 110 aa große RBD bildet eine Klammer-artige Struktur aus, die aus α -Helices und β -Faltblättern besteht (Yan et al., 2003). Die prominentesten RBPs mit PAZ-Domäne sind die Argonautenproteine und Dicer, die in den RNAi-Mechanismus der Eukaryoten involviert sind und die Stilllegung bestimmter Transkripte durch entsprechende „Antisense“-RNA ermöglichen (Hutvagner and Simard, 2008). Dieser Mechanismus kann zwar im einzelligen Pilz *Schizosaccharomyces pombe* beobachtet werden, ist jedoch vermutlich in seinem nahen Verwandten *S. cerevisiae* im Laufe der Evolution verloren gegangen.

Im Allgemeinen verfügen RBPs nicht nur über eine der oben genannten RBDs, sondern enthalten oft mehrere Kopien derselben RBD (Lunde et al., 2007). Darüber hinaus werden häufig verschiedene Domänen innerhalb eines Proteins kombiniert, um die Spezifität bei der Zielerkennung zu erhöhen. Dieser modulare Aufbau erstreckt sich ferner auf zusätzliche nicht-RBDs, die z. B. die Interaktion mit anderen Proteinen vermitteln, um größere Komplexe auszubilden.

1.3.2 Übersicht des mRNA-Metabolismus: vom Transkript zum Protein

RBPs sind an allen Prozessen des RNA-Metabolismus beteiligt und bieten der Zelle auf diese Weise die Möglichkeit neben der transkriptionellen Regulation, die für ca. 70% der veränderten Proteinmengen verantwortlich ist, weiteren, posttranskriptionellen Einfluss auf die Genexpression auszuüben (Ghaemmaghami et al., 2003; Lu et al., 2007). Theoretisch kann sich eine solche differentielle Regulation sowohl auf der rRNA-, tRNA- als auch der

mRNA-Ebene erstrecken. Im Folgenden soll der Schwerpunkt jedoch auf die Regulation des mRNA-Metabolismus und im Speziellen der Translationsinitiation durch RBPs gelegt werden. Aus diesem Grund werden zunächst die wichtigsten Schritte des mRNA-Metabolismus kurz umrissen und im Fall der Translationsinitiation genauer betrachtet (Abb. 3).

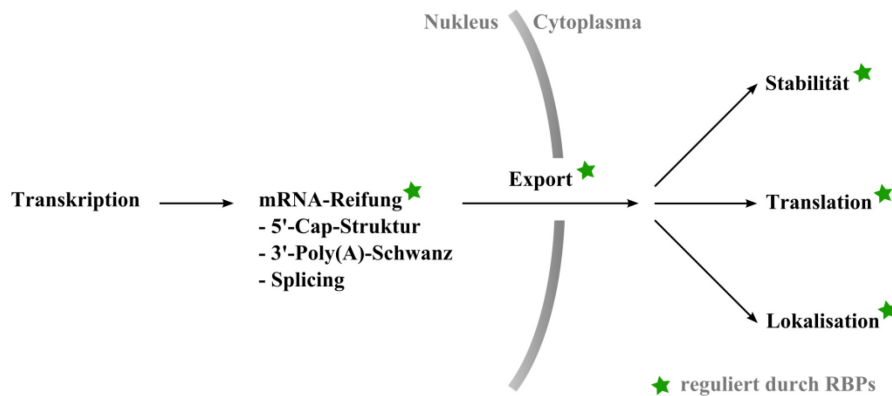


Abb. 3: Schema des mRNA-Metabolismus und der Regulationspunkte durch RBPs.

Nach erfolgter Transkription wird die pre-mRNA zunächst verschiedenen Reifungsprozessen unterzogen, die das Anfügen einer Cap-Struktur ans 5'-Ende, das Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes ans 3'-Ende und gegebenenfalls Splicing miteinbeziehen und das Mitwirken diverser RBPs erfordern. Daraufhin erfolgt der Export der mRNA in Assoziation mit RBPs und anderen Faktoren ins Cytoplasma. Dort kann sowohl die Stabilität der mRNA, deren Lokalisation sowie die Translationseffizienz durch RBPs reguliert werden.

In Prokaryoten sind Transkription und Translation physikalisch gekoppelt, während diese Prozesse in Eukaryoten sowohl räumlich als auch zeitlich getrennt sind. Nach der Transkription wird die erzeugte pre-mRNA im Kern zunächst verschiedenen Reifungsmechanismen unterzogen (McCarthy, 1998). Dazu wird sowohl das Anhängen der Cap-Struktur an das 5'-Ende der mRNA als auch das Anfügen des Poly(A)-Schwanzes an das 3'-Ende gezählt. Ferner kann die „pre“-mRNA sogenanntem Splicing unterzogen werden, bei dem Introns aus dem kodierenden Bereich entfernt werden. Allerdings kommt dieser Prozess in *S. cerevisiae* nur in wenigen Fällen vor. Danach erfolgt die Assemblierung mit diversen RBPs und Exportfaktoren, um den mRNA-Protein- (mRNP-) Komplex aus dem Kern ins Cytoplasma zu translozieren. Dort findet nach der Entlassung der Exportfaktoren schließlich die Aktivierung der mRNA und der kleinen 40S Untereinheit des Ribosoms statt, um die Translation zu initiieren (Hinnebusch, 2011). Zu diesem Zweck erkennt der Translationinitiationsfaktor eIF4E die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA und rekrutiert weitere Faktoren wie eIF4G, eIF4A und eIF4B. Die 40S Untereinheit liegt nach der

Beendigung eines Translationszyklus zunächst mit den Faktoren eIF1, eIF1A, eIF3 und eIF5 assoziiert vor. Die Rekrutierung der Start-tRNA erfolgt durch das trimere eIF2, welches nur in seiner GTP-gebundenen Form an die Start-tRNA binden kann. Dieser ternäre Komplex bindet ebenfalls an die kleine Untereinheit und führt zur Formierung des 43S-Präinitiationskomplexes, welcher schließlich in der Lage ist die aktivierte mRNA zu binden. Daraufhin „scannt“ der 43S-Komplex die mRNA nach dem Startcodon AUG unter Verbrauch von ATP, das u. a. zur Entwindung von Sekundär- und Tertiärstrukturen innerhalb der mRNA durch eIF4A/B bzw. Ded1 benötigt wird. Nach Erreichen des Startcodons wird die GTP-Hydrolyse durch eIF2 stimuliert, was zur Dissoziation diverse Translationsinitiationsfaktoren wie eIF1, eIF2, eIF3, eIF4B und eIF5 von der kleinen ribosomalen Untereinheit führt. Dies wiederum erlaubt die Assoziation des GTP-gebundenen eIF5B und der großen ribosomalen 60S Untereinheit. Nach erneuter GTP-Hydrolyse dissoziieren auch eIF1A und eIF5B, so dass die Translationselongation und -termination mit Hilfe von weiteren Faktoren erfolgen kann. Darüber hinaus unterliegen manche Transkripte einer zusätzlichen räumlichen Kontrolle (Gonsalvez et al., 2005). So werden während der Mitose z. B. mindestens 24 Transkripte (u. a. die *ASH1*-mRNA) asymmetrisch verteilt, um das jeweilige Genprodukt in der Mutter- oder Tochterzelle zu akkumulieren.

1.3.3 Regulatorische Elemente von mRNAs

Um die posttranskriptionelle Kontrolle von mRNAs durch RBPs zu ermöglichen, verfügen mRNAs über diverse regulatorische Elemente und strukturelle Eigenschaften, die von RBPs erkannt und gebunden werden können (Abb. 4) (Gebauer and Hentze, 2004). Während des Reifungsprozesses werden die Ende mit kanonischen Modifikationen wie der 5'-Cap-Struktur und dem 3'-Poly(A)-Schwanz versehen, die essentiell zur Stabilität und Translatierbarkeit des Transkriptes beitragen. Neben dem kodierenden mittleren Teil befinden sich zudem untranslatierte Bereiche (5'-UTR, 3'-UTR) an den beiden Enden der Transkripte, in denen RBPs binden, um die Transkriptstabilität und Translationseffizienz zu beeinflussen. Dabei ist die 5'-UTR mit einer durchschnittlichen Größe von 200 bp etwas kürzer als die 3'-UTR mit ca. 300 bp und verfügt über einen höheren GC-Gehalt als die 3'-UTR (Pesole et al., 2000). Prinzipiell können mRNAs diverse Sekundär- und Tertiärstrukturen wie z. B. Haarnadelstrukturen oder Pseudoknoten annehmen, die häufig inhibierende Auswirkungen auf die Translation haben (Sagliocco et al., 1993). Eine Ausnahme bilden sogenannte „internal ribosomal entry sites“ (IRES), welche die Rekrutierung von Ribosomen unabhängig

von der normalen Translationsinitiation erlauben (Filbin and Kieft, 2010). Dieser Mechanismus ist v. a. in bestimmten Stresssituation von Nutzen, da die Existenz einer IRES die Translation des Genproduktes trotz allgemeiner Reduktion der Proteinproduktion ermöglicht.

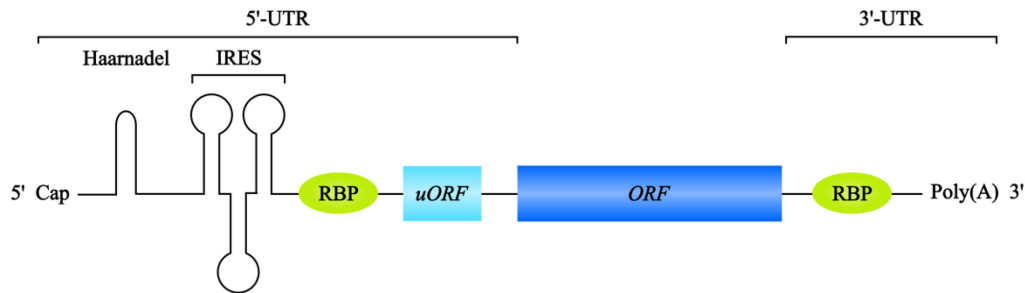


Abb. 4: Schema der wichtigsten regulatorischen und strukturellen Elemente einer mRNA zur Translationskontrolle durch RBPs.

Prinzipiell unterscheidet man drei Regionen innerhalb einer mRNA: die 5'-UTR („untranslated region“), deren Ende durch eine Cap-Struktur geschützt ist, die kodierende mittlere Region (ORF = „open reading frame“) sowie die 3'-UTR mit dem terminalen Poly(A)-Schwanz. Die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen wie Haarnadelstrukturen üben häufig inhibierende Funktionen aus, während sogenannte IRES („internal ribosomal entry site“) die Translationsinitiation unabhängig von der Cap-Struktur fördern. Ferner kann die Bindung von spezifischen Motiven innerhalb der 5'- oder 3'-UTR durch RBPs die Translationseffizienz beeinflussen. Schema modifiziert nach Gebauer und Hentze (2004).

Ein weiteres regulatorisches Element stellen sogenannte *uORFs* in der 5'-UTR einiger Transkripte dar, welche typischer Weise die Translation vom eigentlichen, stromabwärts gelegenen Haupt-ORF verringern (Hood et al., 2009).

Im Folgenden sollen einige Beispiele aufgeführt werden, mit deren Hilfe RBPs verschiedene Prozesse des mRNA-Metabolismus regulieren. Im Speziellen soll die mRNA-Stabilität, die Translationsinitiation und die Lokalisation von mRNAs in Abhängigkeit von RBPs behandelt werden.

1.3.4 Mechanismen zur Regulation der mRNA-Stabilität durch RBPs

Im Allgemeinen wird die Stabilität von mRNAs durch das Vorhandensein der Cap-Struktur und die Länge des Poly(A)-Schwanzes bestimmt. Einige RBPs sind in der Lage nach der Bindung der Transkripte zusätzliche Faktoren zu rekrutieren, um diese Strukturen zu verändern und somit die Stabilität der mRNAs zu beeinflussen. Das nicht essentielle Poly(U)-bindende Protein Pub1 z. B., das drei RRM und drei Gln/Asp-reiche Regionen enthält, erkennt sogenannte stabilisierende Elemente (STE) in der 5'-UTR der *YAPI*- und *GCN4* –

Transkripte und verhindert auf diese Weise deren Degradation durch die NMD-Maschinerie (Ruiz-Echevarría and Peltz, 2000). Im Gegensatz dazu übt das PUF-Motiv enthaltene Mpt5 in den meisten Fällen einen negativen Einfluss auf seine gebundenen mRNAs aus (Quenault et al., 2011). Nach der Bindung bestimmter Sequenzen in den 3'-UTRs der Ziel-mRNAs rekrutiert Mpt5 den Ccr4-Pop2-NOT-Deadenylasekomplex, den Decapierungsaktivator und translationellen Repressor Dhh1 sowie den Decapierungsfaktor Dcp1 (Goldstrohm et al., 2007). Dieser Komplex leitet daraufhin die Entfernung der 5'-Cap-Struktur und des Poly(A)-Schwanzes ein, was schließlich zum Abbau des Transkriptes führt. Dieser Repressionsmechanismus durch PUF-Proteine ist hoch konserviert und konnte bereits in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, dem Menschen und anderen Organismen beschrieben werden (Quenault et al., 2011).

1.3.5 Mechanismen zur Regulation der Translationseffizienz durch RBPs

Im Rahmen der Translationskontrolle können zunächst Mechanismen zur Reduktion der globalen Translationsrate von Transkript-spezifischen Regulationen unterschieden werden (Gebauer and Hentze, 2004). In der globalen Translationskontrolle spielen häufig Interaktionen mit oder Modifikationen von Translationsinitiationsfaktoren eine entscheidende Rolle. Das Poly(A)-bindende Protein Pab1 z. B. bindet mit Hilfe seiner vier RRM's an den Poly(A)-Schwanz von mRNAs und fördert durch die Interaktion mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G an der Cap-Struktur die Ausbildung einer Ringstruktur der mRNA, um eine rapide Translationsreinitiation nach erfolgter Termination zu ermöglichen (Tarun and Sachs, 1996; Wells et al., 1998). Ein weiteres Beispiel stellen der Translationsinitiationsfaktor eIF4A und das essentielle DEAD/DEAH-box RBP Ded1 dar, die beide in das „Scanning“ der 5'-UTR durch die ribosomale 40S-Untereinheit zu Beginn der Translation beteiligt sind (Marsden et al., 2006). Beide Proteine fungieren als RNA-Helikasen, wobei eIF4A wahrscheinlich eher lokale, lockerere RNA-Strukturen auflöst, während Ded1 aufgrund seiner stärkeren Helikaseaktivität stabilere Sekundärstrukturen auflösen könnte. Auf diese Weise wird ein Stillstand der 40S-Untereinheit durch störende RNA-Strukturen minimiert. Auf der anderen Seite können bestimmte Modifikationen von Translationsinitiationsfaktoren auch zu einer Verschlechterung der allgemeinen Translation führen. So wird eIF2A z. B. in Folge von Aminosäuremangel durch Gcn2 phosphoryliert, was den Austausch von GDP zu GTP in eIF2A verhindert und somit dessen Recycling für eine neue Translationsrunde blockiert (Rowlands et al., 1988; Dever et al., 1992).

Bei der Transkript-spezifischen Translationskontrolle spielen RBPs v. a. während der Identifikation der korrekten Ziel-mRNAs eine entscheidende Rolle. Zu diesem Zweck binden sie spezifische Elemente, die v. a. in der 5'- und 3'-UTR lokalisiert sind.

Ein Beispiel für die translationelle Initiationsrepression durch RBPs stellen 4E-bindende Proteine (4E-BP) dar (Richter and Sonenberg, 2005). 4E-BPs sind in der Lage den Translationsinitiationsfaktor eIF4E zu binden und auf diese Weise dessen Interaktion mit eIF4G zu verhindern. Dies führt schließlich zur Inhibierung der Assoziation zwischen dem 43S-Präinitiationskomplex und der mRNA und folglich zur Verhinderung der Translation. *S. cerevisiae* kodiert für insgesamt zwei 4E-BPs, Caf20 und Eap1, die jeweils verschiedene Transkripte kontrollieren (Cridge et al., 2010). Diese Spezifität wird wahrscheinlich durch die Interaktion mit RBPs wie den PUF-Proteinen erreicht, da Caf20 in Immunopräzipitationsexperimenten in spezifischen RNA-stabilisierten Komplexen mit Puf4/Mpt5 gefunden werden konnte, während Eap1 vorrangig mit Puf1/Puf2 assoziiert war. Auf diese Weise rekrutieren RBPs spezifische Proteine/Komplexe zur Inhibition einzelner Transkripte.

1.3.6 Mechanismen zur Regulation der mRNA-Lokalisation durch RBPs

Des Weiteren können RBPs auch die zelluläre Lokalisation von einzelnen Transkripten beeinflussen. Dabei rekrutieren sie nach erfolgter Bindung der Ziel-mRNA cytoskeletale Motorproteine, um die RNP-Komplexe über Aktinkabel oder Mikrotubuli an distinkte Orte innerhalb der Zelle zu transportieren (Jansen and Niessing, 2012). Dabei ist die Translation während des Transportes in der Regel durch andere spezifische RBPs inhibiert und findet erst am Zielort räumlich abgegrenzt statt, um einen Proteingradienten zu erzeugen. Prominente Beispiele sind v. a. die asymmetrische Transkriptlokalisation von Morphogenen während der Oogenese und Embryogenese in *Drosophila melanogaster* sowie der gerichtete mRNA-Transport in die Tochterzelle von *S. cerevisiae* während der Mitose (Müller et al., 2007; Lipshitz, 2009). Im Folgenden soll die kombinatorische Regulation des *ASH1*-Transkriptes in knospendenden *S. cerevisiae* Zellen näher besprochen werden (Abb. 5). *ASH1* kodiert für einen Transkriptionsinhibitor, der nur in der Tochterzelle exprimiert wird und dort die Expression des *HO*-Gens inhibiert, um den Kreuzungstypwechsel zu verhindern (Sil and Herskowitz, 1996). Dabei wird die räumliche Lokalisation von Ash1 v. a. durch drei RBPs erreicht, She2, Khd1 und Puf6. Zunächst binden She2-Dimere spezifische Elemente in der ORF-Region und 3'-UTR der *ASH1*-mRNA, was die Assoziation mit dem Adapterprotein She3 begünstigt und das Motorprotein Myo4 rekrutiert (Bobola et al., 1996; Jansen et al., 1996).

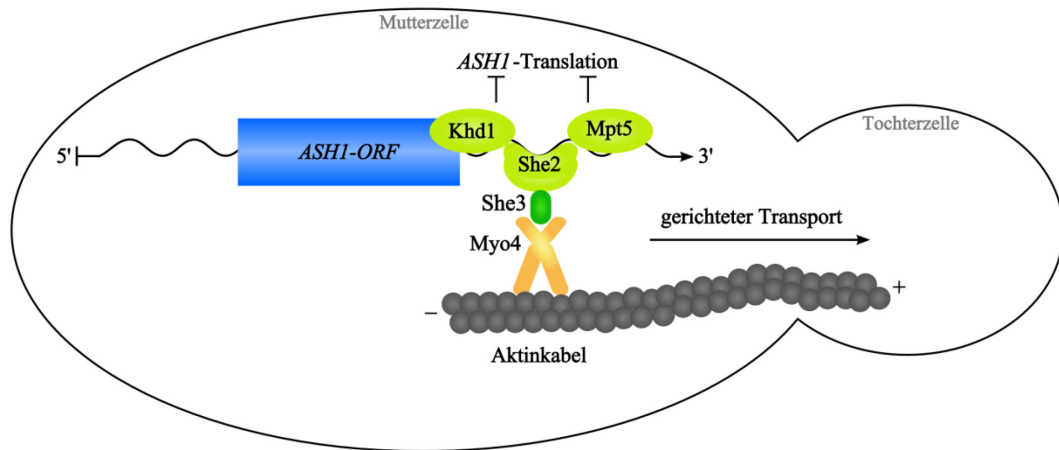


Abb. 5: Kombinatorische Kontrolle der *ASH1*-Expression durch verschiedene RBPs.

Die Expression des Transkriptionsinhibitors Ash1 ist auf die Tochterzelle beschränkt. Die Bindung des RBPs She2 und die Rekrutierung des Adapters She3 sowie des Motorproteins Myo4 ermöglichen den zur Tochterzelle gerichteten Transport der *ASH1*-mRNA entlang von Aktinkabeln. Währenddessen verhindern die beiden RBPs Khd1 und Mpt5 die Translation von *ASH1*.

Daraufhin wird die *ASH1*-mRNA aktiv über Aktinfilamente von der Mutter- in die Tochterzelle transportiert. Während dieses Transportes wird die Translation der *ASH1*-mRNA durch die Bindung der beiden RBPs Khd1 (3 KH-Domänen) und Puf6 (PUF-Domäne) inhibiert (Irie et al., 2002; Gu et al., 2004). Auf diese Weise wird die *ASH1*-mRNA ausschließlich in der Tochterzelle exprimiert und der daraus resultierende Ash1-Proteingradient ermöglicht es ausschließlich der Mutterzelle ihren Kreuzungstyp zu wechseln. Neben Puf6 kontrollieren weitere PUF-Proteine die Lokalisation bestimmter mRNAs in *S. cerevisiae*. So vermittelt Puf3 den Transport von mRNAs zu den Mitochondrien, während Mpt5 an der Lokalisation der *PEX14*-mRNA zu den Peroxisomen beteiligt ist (Saint-Georges et al., 2008; Zipor et al., 2009).

1.3.7 Mechanismen zur Regulation von Signalnetzwerken durch RBPs

Systematische Studien von RBP-mRNA-Interaktionen zeigten, dass individuelle RBPs häufig mit einer spezifischen Klasse von Transkripten assoziiert sind, welche ähnliche Funktionen oder cytotopische Eigenschaften aufweisen (Gerber et al., 2004; Hogan et al., 2008). Dies konnte z. B. für einige PUF-Proteine aus *S. cerevisiae* gezeigt werden (Gerber et al., 2004). So bindet Puf3 fast ausschließlich mRNAs für Mitochondrien-lokalisierte Proteine, während Puf1/2 bevorzugt mit Transkripten, die für Membran-assoziierte Proteine kodieren, assoziieren und Puf4 mit mRNAs für nukleoläre, ribosomale RNA-Prozessierungsfaktoren. Mpt5 bindet v. a. mRNAs, die für Chromatin-modifizierende Faktoren und Komponenten des

Spindelpolkkörpers kodieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass RBPs in der Lage sein könnten durch die Bereitstellung ausreichender Proteinmengen bestimmter Regulatoren ganze Signaltransduktionskaskaden zu steuern. Mpt5 könnte diese Rolle während der Regulation der Adhäsion erfüllen (Abb. 6).

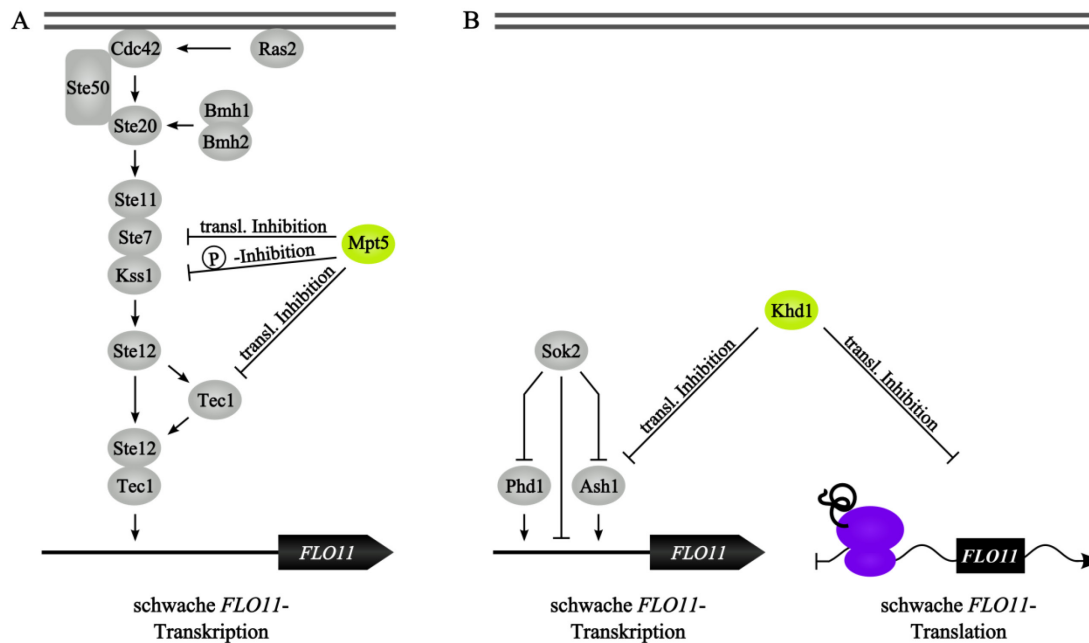


Abb. 6: „Feed-Forward“-Inhibition der *FLO11*-Expression durch die RBPs Mpt5 und Khd1.

(A) Das PUF-Domänen RBP Mpt5 reguliert in manchen Stammhintergründen drei Komponenten der Kss1-/MAPK-Kaskade auf posttranskriptioneller Ebene, um die *FLO11*-Transkription effizient zu inhibieren. Zum einen reprimiert Mpt5 die Proteinmengen der MAPKK Ste7 sowie des Transkriptionsaktivators Tec1 und zum anderen inhibiert es die Phosphorylierung von Ste7 durch Kss1. (B) Duale Kontrolle von *FLO11* durch das KH-Domänen RBP Khd1. Khd1 reprimiert *FLO11* sowohl auf transkriptioneller Ebene durch posttranskriptionelle Kontrolle des Transkriptionsaktivators Ash1 als auch auf translationeller Ebene durch direkte Bindung von repetitiven Sequenzen innerhalb der *FLO11*-mRNA.

So beeinflusst Mpt5 in bestimmten Stammhintergründen gleich drei Komponenten der Kss1-/MAPK-Kaskade negativ (Prinz et al., 2007). Einerseits reprimiert Mpt5 die Proteinmengen der MAPKK Ste7 und des Transkriptionsaktivators Tec1 durch posttranskriptionelle Kontrolle der jeweiligen mRNAs. Des Weiteren hemmt Mpt5 auf bisher unbekannte Weise eine potentielle positive „Feedback“-Schleife der Kss1-/MAPK-Kaskade, nämlich die Phosphorylierung von Ste7 durch die MAPK Kss1. Folglich könnte Mpt5 mit Hilfe dieser Regulationsmechanismen dazu beitragen die *FLO11*-Expression in Abwesenheit von stimulierenden Faktoren effizient zu inhibieren und einen rapiden, dynamischen Wechsel zwischen den beiden Zuständen „an“ und „aus“ zu ermöglichen.

Ein weiteres Beispiel eines solchen zentralen Schalters stellt das KH-Domänen RBP Khd1 dar, das ebenfalls in die Regulation des filamentösen Wachstums involviert ist. Einerseits

reprimiert Khd1 die *FLO11*-Expression indirekt durch translationelle Inhibierung des Transkriptionsfaktors Ash1, der als Aktivator der *FLO11*-Transkription fungiert (Chandarlapaty and Errede, 1998; Wolf et al., 2010). Andererseits blockiert Khd1 durch direkte Bindung von repetitiven Sequenzen innerhalb der *FLO11*-mRNA die Translation von *FLO11*. Mit Hilfe dieser „Feed-Forward“-Inhibition, die sich auf transkriptioneller sowie translationeller Basis erstreckt, könnte Khd1 ebenfalls eine dynamische *FLO11*-Expression gewährleisten.

Diese Beispiele zeigen, dass RBPs durch die posttranskriptionelle Regulation von Zielgenen in der Lage sind Signalnetzwerke effizient und dynamisch zu kontrollieren. Das RRM-Domänen Protein Whi3 scheint ebenfalls in die Regulation der Adhäsion involviert zu sein. Ob die zugrunde liegende Whi3-vermittelte Kontrolle der *FLO11*-Expression ähnlich komplex wie die von Mpt5 und Khd1 ist, sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.4 Das RNA-Bindeprotein Whi3

Das RBP Whi3 wurde ursprünglich als dosisabhängiger Zellgrößenregulator identifiziert (Nash et al., 2001; Jorgensen et al., 2002). Während *WHI3*-defiziente *S. cerevisiae* Zellen ein ca. 20% kleineres Volumen als vergleichbare *WHI3*-Zellen bei der G1/S-Transition aufweisen, führt eine Erhöhung der Gendosis zu einer graduellen Zellvergrößerung und die Überexpression des RBPs sogar zu einem letalen G1-Arrest (Nash et al., 2001). Dabei wird die Wachstumsgeschwindigkeit der verschiedenen Mutanten jedoch nicht signifikant durch *WHI3* beeinflusst. Im Rahmen der Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus der Zellgrößenregulation durch Whi3 konnten zwei funktionelle Domänen innerhalb des 661 aa großen RBPs identifiziert werden (Abb. 7). Im N-terminalen Teil von Whi3 befindet sich die sogenannte „Cdc28-recruitment region“ (CRR), die sich von Aminosäure 121 bis 220 erstreckt und nötig sowie hinreichend für die *in vivo* Bindung der zentralen Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28 ist (Wang et al., 2004). Des Weiteren ist im C-terminalen Teil die 80 bis 90 bp lange RBD vom Typ RRM lokalisiert (Nash et al., 2001). Diese soll Voraussagen zufolge in der Lage sein die Struktur bereits bekannter RRM-Domänen anzunehmen. Ferner zeigten Immunopräzipitationsanalysen, dass Whi3 in der Lage ist mindestens 300 verschiedene mRNAs *in vivo* zu binden (Colomina et al., 2008).



Abb. 7: Domänenstruktur des RBPs Whi3.

Mit Hilfe der „Cdc28-recruitment region“ (CRR) im N-terminalen Teil ist Whi3 in der Lage die Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 *in vivo* zu binden, während das „RNA-recognition motif“ (RRM) bestehend aus RNP1 und RNP2 im C-terminalen Teil die Assoziation mit diversen mRNAs erlaubt. Der Glutamin- (Q-) reichen Region konnten bisher keine funktionellen Eigenschaften zugeordnet werden.

Bioinformatische Analysen dieser Transkripte konnten die putative Konsensussequenz GCAU identifizieren (Colomina et al., 2008; Riordan et al., 2011). Dieses Motiv scheint zumindest für die Whi3-kontrollierte Lokalisation der *CLN3*-mRNA verantwortlich zu sein, da die Mutation von insgesamt 10 GCAU-Tetranukleotiden innerhalb der *CLN3*-mRNA zu einer Verschlechterung der Interaktion mit Whi3 führt. Interessanter Weise sind sowohl die CRR- als auch die RRM-Domäne unbedingt notwendig für die Regulation der Zellgröße und zur Ausprägung des filamentösen Wachstums (Nash et al., 2001; Wang et al., 2004). So weisen Mutanten mit bestimmten Punktmutationen in einer der beiden Domänen phänotypische Ausprägungen einer kompletten *WHI3*-Deletion auf. Neben diesen beiden Hauptdomänen verfügt Whi3 ferner über eine Glutamin-reiche Region (247 bis 277 aa), über dessen Funktion jedoch bisher keine Daten erhoben wurden.

1.4.1 Regulation der Zellgröße durch Whi3

Untersuchungen zur Rolle von Whi3 während der Zellgrößenkontrolle ergaben u. a., dass die Expression der G1/S-spezifischen Gene *CLN2*, *CLB5* und *SWI4* in *WHI3*-defizienten Zellen bereits nach 60 statt 90 min induziert wird (Garí et al., 2001). Dieser Befund legte den Schluss nahe, dass Whi3 eventuell den G1/S-Übergang kontrollieren könnte. Da für diesen Prozess hauptsächlich das G1-Cyclin Cln3 und die zentrale Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 verantwortlich sind, wurden die genetischen und biochemischen Zusammenhänge zwischen diesen beiden Faktoren und Whi3 näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Whi3 tatsächlich in der Lage ist die *CLN3*-mRNA über seine RRM *in vivo* zu binden und somit dessen Lokalisation innerhalb des Cytoplasmas zu bestimmen (Garí et al., 2001). Des Weiteren akkumulieren sowohl Cln3 als auch Cdc28 in Abwesenheit von *WHI3* schneller im Kern als in *WHI3*-Zellen (Wang et al., 2004). Darüber hinaus werden jedoch keine weiteren Parameter wie die Transkript- oder Proteinmenge, der Phosphorylierungsgrad oder das

Polysomenprofil von Cln3 durch die An- oder Abwesenheit von *WHI3* beeinflusst (Garí et al., 2001). Aufgrund dieser Daten wurde schließlich ein Modell zur Whi3-vermittelten Regulation der Zellgröße postuliert. Dabei fungiert Whi3 als cytoplasmatischer Retentionsfaktor für den Cdc28-Cln3-Komplex und kontrolliert somit die Passage durch Start während der G1/S-Transition (Abb. 8) (Wang et al., 2004; Aldea et al., 2007).

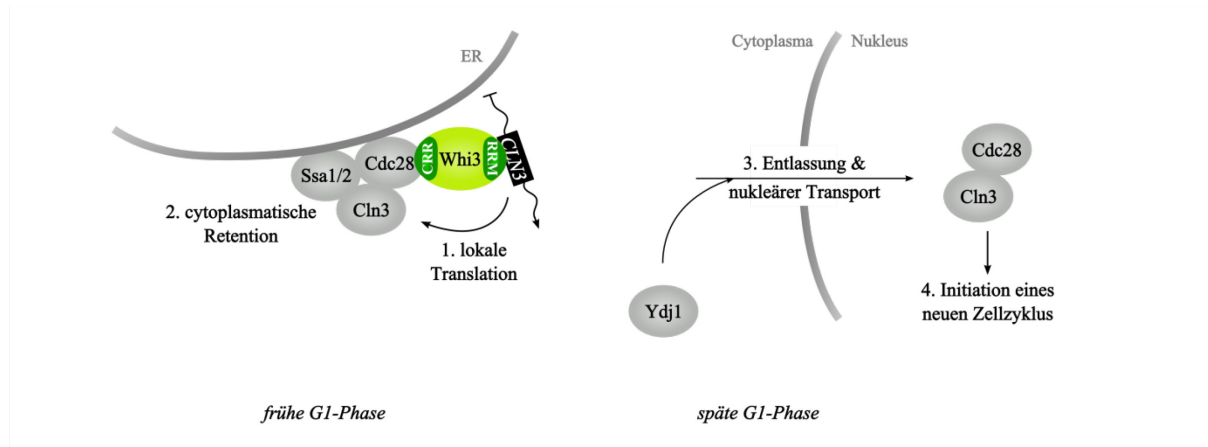


Abb. 8: Schema zur Regulation der G1/S-Transition durch Whi3.

Whi3 bindet die mRNA des G1-Cyclins *CLN3* durch seine RRM sowie die zentrale Kinase Cdc28 mit Hilfe seiner CRR. Über Cdc28 wird dieser trimere Komplex zum ER rekrutiert. Die lokale Translation von *CLN3* ermöglicht die schnelle Assoziation von Cln3 mit Cdc28, was zusätzlich durch die Chaperone Ssa1 und Ssa2 gefördert wird. Whi3 und die beiden Chaperone halten den Cdc28-Cln3-Komplex so lange im Cytoplasma zurück bis ein bisher unbekanntes Signal die Entlassung und somit die nukleäre Akkumulation von Cdc28-Cln3 erlaubt. Dieses Dissoziationssignal könnte eventuell durch die Akkumulation eines weiteren Chaperons, Ydj1, ausgelöst werden. Im Kern induzieren Cdc28-Cln3 die Expression von Zielgenen zur Initiation eines neuen Zellzyklus (G1/S-Transition). Nähere Erläuterungen siehe Text. Schema modifiziert nach Aldea (2007).

Zu Beginn eines neuen Zellzyklus muss die zentrale Cyclin-abhängige Kinase Cdc28 mit dem G1-Cyclin Cln3 assoziieren, um mit Hilfe des Kernlokalisationssignals (NLS) von Cln3 in den Nukleus zu gelangen (Wang et al., 2004). Im Kern aktiviert der Cdc28-Cln3-Komplex schließlich die Transkription von Zielgenen mit Hilfe der Transkriptionskomplexe MBF (Mbp1-Swi6) und SBF (Swi4-Swi6), die den G1/S-Übergang einleiten (Enserink and Kolodner, 2010). Dem aktuellen Modell zufolge bindet Whi3 sowohl die *CLN3*-mRNA mit Hilfe der RRM als auch Cdc28 mit Hilfe der CRR. Ferner soll Cdc28 diesen Komplex durch Bindung von Gerüstproteinen ans ER lokalisieren (Aldea et al., 2007). Die räumliche Nähe der *CLN3*-mRNA und der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28 durch Whi3 soll schließlich die lokale Translation von *CLN3* und die sofortige Assoziation des neu-synthetisierten Cyclins mit Cdc28 ermöglichen. Anschließend soll Whi3 den Cdc28-Cln3-Komplex so lange im Cytoplasma zurückhalten bis eine kritische Zellgröße erreicht ist und ein bisher unbekanntes

Signal die Dissoziation von Cdc28-Cln3 erlaubt. Cdc28-Cln3 ist daraufhin in der Lage in den Kern zu translozieren und einen neuen Zellzyklus zu initiieren.

Aldea et al. spekulieren, dass das unbekannte Dissoziationssignal eventuell über die Chaperone Ssa1/2 und Ydj1 vermittelt werden könnte (Aldea et al., 2007). Dieser Hypothese zufolge sollen die beiden Chaperone Ssa1/2 für die Assoziation des frisch-synthetisierten Cln3 und Cdc28 notwendig sein und anschließend an diesem Komplex haften bleiben, so dass sie dessen vorzeitige Translokation in den Kern verhindern. Nachdem in der späten G1-Phase ein weiteres Chaperon Ydj1 ausreichend akkumuliert ist, könnte dieses die ATPase-Aktivität in Ssa1/2 aktivieren und somit die Entlassung von Cdc28-Cln3 vom ER ermöglichen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist Whi3 in der Lage in Immunopräzipitationsstudien mit den beiden Chaperonen Ssa1/2 zu interagieren (Wang et al., 2004). Des Weiteren postulieren Colomina et al., dass Whi3 generell in den exocytotischen Transport bestimmter Proteine involviert sein könnte, da viele Whi3-gebundene mRNAs funktionell mit dem ER assoziiert sind (Colomina et al., 2008). Demnach würde die Whi3-vermittelte Rekrutierung dieser mRNAs zum ER deren kotranskriptionellen Import ins ER ermöglichen.

Ferner wurde Whi3 mit der Regulation des Zellzyklus durch die Involvierung in bestimmte Histonmodifikationen in Zusammenhang gebracht (Schulze et al., 2009). Dabei wird Whi3 auf bisher unbekannte Weise für die Entfernung von Dimethylen vom H3-Histon benötigt, ein Prozess, der am G1/S-Übergang vollzogen wird.

Weitere Daten deuten jedoch darauf hin, dass Whi3 die Zellgröße nicht allein durch die cytoplasmatische Retention des Cdc28-Cln3-Komplexes vollzieht, sondern zusätzliche Effektoren für diese Regulation besitzt. So bindet Whi3 neben der *CLN3*-mRNA ebenfalls die mRNA der beiden G1-Cyclins Cln1 und Cln2 und könnte auf diese Weise zusätzlichen Einfluss auf den Verlauf des Zellzyklus ausüben (Garí et al., 2001; Colomina et al., 2008). Außerdem supprimieren die einzelnen Überexpressionen von *CLN2* oder *CLN3* den G1-Arrest einer *WHI3*^{hc}-Mutante nur geringfügig und können die Letalität dieses Stamms nicht verhindern (Garí et al., 2001; Nash et al., 2001). Whi3 selbst unterliegt ebenfalls einer moderaten Zellzykluskontrolle. So sinkt die *WHI3*-Expression zunächst innerhalb der G1-Phase und erreicht ein leichtes Maximum in der G2-Phase (Spellman et al., 1998).

1.4.2 Regulation weiterer Prozesse durch Whi3

Abgesehen vom filamentösen Wachstum und der Zellgrößenkontrolle ist Whi3 ebenfalls in die Regulation der Meiose und Sporulation involviert (Garí et al., 2001). Haploide *whi3Δ*-

Zellen sind fast steril und weder in der Lage einen G1-Arrest auszuführen noch morphologische Änderungen oder die transkriptionelle Aktivierung von Konjugationszielgenen nach der Exposition gegenüber α -Faktor zu initiieren. Ferner ist der Eintritt in die meiotische S-Phase und die Sporulation in *WHI3*-defizienten Zellen gestört (Garí et al., 2001). Erneut sind für die Ausbildung dieser Phänotypen beide Domänen innerhalb von Whi3 essentiell. Die zusätzliche Deletion des *CLN3*-ORFs kann die Meiose-Defekte der *whi3 Δ* -Mutante supprimieren. Da Cln3 die Expression und nukleäre Akkumulation des Hauptregulators der Meiose, Ime1, inhibiert und somit den Eintritt in die Meiose verhindert, könnte Whi3 durch die räumliche Retention von Cln3 dessen Einfluss auf Ime1 minimieren (Colomina et al., 1999).

Darüber hinaus scheint Whi3 auch am apikalen Wachstum während der Knospung beteiligt zu sein, da neben der Zellgröße auch die Zellform von *S. cerevisiae* Zellen von der *WHI3*-Dosis abhängt (Colomina et al., 2009). So weisen *whi3 Δ* -Mutanten meist rundere Zellen/Knospen als *WHI3*-Stämme auf, während die Erhöhung der *WHI3*-Menge zu elongierten Zellen/Knospen führt. Als potentielle Effektoren von Whi3 werden die G1-Cycline Cln1 und Cln2 diskutiert, deren mRNA *in vivo* durch Whi3 gebunden wird (Garí et al., 2001; Colomina et al., 2008). Cln1 und Cln2 wiederum werden in Assoziation mit der zentralen Cyclin-abhängigen Kinase Cdc28 für die Knospung sowie das polarisierte Wachstum an der Sprossspitze nach der G1/S-Transition benötigt und sind u. a. an der Aktinfilamentformation während dieses Prozesses beteiligt (Lew and Reed, 1993; McCusker et al., 2007). Die Gruppe um Aldea konnte zeigen, dass Cdc28 während der S-Phase kurzzeitig an der Sprossspitze akkumuliert und diese Ansammlung in Abwesenheit von *WHI3* reduziert ist (Colomina et al., 2009). Ferner können die Elongationsdefekte einer *whi3 Δ* -Mutante durch die Überexpression von *CLN2* und in geringerem Maße von *CLN1* supprimiert werden. Aufgrund dieser Daten wurde ein Modell postuliert, in dem Whi3 für die apikale Lokalisation des Cdc28-Cln1/2-Komplexes während der Knospung benötigt wird und somit die lokale Aktivierung der kleinen Rho-ähnlichen GTPase Cdc42 und deren Effektoren in der Knospungsspitze ermöglicht (McCusker et al., 2007; Colomina et al., 2009). Unterstützt wird diese Hypothese weiterhin durch die Beobachtung, dass das Aktincytoskelett der Knospe im *whi3 Δ* -Hintergrund geringfügig gestört ist.

Letztendlich könnte Whi3 außerdem in die Regulation der Zellwandintegrität involviert sein, die nicht nur während der Mitose (v. a. während der Knospung und Cytokinese) sondern auch beim filamentösen Wachstum eine wichtige Rolle spielt, um die Unversehrtheit der Zelle

während dieser Entwicklungsprogramme zu gewährleisten (Ragni et al., 2011). Dieser Zusammenhang wurde innerhalb einer genetischen Analyse zur Identifizierung von synthetisch letalen Genen für das Zellwandprotein Ccw12 entdeckt, das für die Stabilität von neusynthetisierter Zellwand in Knospen benötigt wird. Die *whi3* Δ -Mutante weist zwar eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Zellwandinterkalator „Calcofluor White“ auf, wird jedoch nicht für die Zielgenexpression des Zellwandintegritäts- (ZWI-) Signalweges benötigt, wenn dieser durch hyperaktive Allele aktiviert wird (Ragni et al., 2011). Allerdings scheint Whi3 in die Stressantwort infolge von Zellwandstress involviert zu sein. Wie genau diese Verknüpfung aussieht, ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch unbekannt.

Zusammenfassend scheint Whi3 in diverse zelluläre Prozesse involviert zu sein, die zumindest teilweise durch die cytoplasmatische Retention des Cdc28-Cln3-Komplexes erklärt werden können. Darüber hinaus deuten jedoch weitere Daten darauf hin, dass Whi3 auch mit Hilfe von zusätzlichen, bisher unbekannten Effektoren die oben beschriebenen Programme steuern könnte.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Vorangegangene Arbeiten zeigen, dass das RNA-Bindeprotein (RBP) Whi3 diverser zelluläre Prozesse des Zellwachstums und der Differenzierung reguliert, wobei die Whi3-regulierten Signalnetzwerke jedoch weitestgehend unverstanden sind. Aufgrund dessen sollten in dieser Arbeit neue Effektoren von Whi3 identifiziert werden, um nähere Einblicke in die beteiligten Signalwege zu gelangen. Dabei soll ein besonderer Fokus auf der Untersuchung der Adhäsionsregulation durch Whi3 gelegt werden. Die Adhäsion von Pilzen wird durch ein komplexes Netzwerk sowohl auf transkriptioneller, posttranskriptioneller als auch epigenetischer Ebene kontrolliert und ist sowohl von industrieller als auch von medizinischer Bedeutung. Aus diesem Grund sollte die Rolle des RBPs Whi3 innerhalb des *FLO11*-regulierten Netzwerkes näher beleuchtet werden. Ferner bietet diese Studie die Möglichkeit das allgemeine Verständnis der Wirkungsweise und Relevanz von RBPs innerhalb von Signaltransduktionsnetzwerken zu vertiefen.

2 ERGEBNISSE

2.1 Regulation der Biofilmbildung durch Whi3

2.1.1 Whi3 kontrolliert das adhäsive Wachstum über den *FLO11*-Promotor

Vorarbeiten der AG Mösch zeigten, dass die Deletion von *WHI3* zu einer siebenfachen Reduktion der *FLO11*-Expression und einem kompletten Verlust der Adhäsion führt (Abb. 9A und B). Folglich scheint Whi3 ein wichtiger Regulator der Biofilmbildung zu sein, der entweder die Transkription von *FLO11* über dessen Promotor reguliert oder in seiner Funktion als RNA-Bindeprotein (RBP) einen posttranskriptionellen Einfluss auf die *FLO11*-mRNA-Stabilität z. B. ausüben könnte.

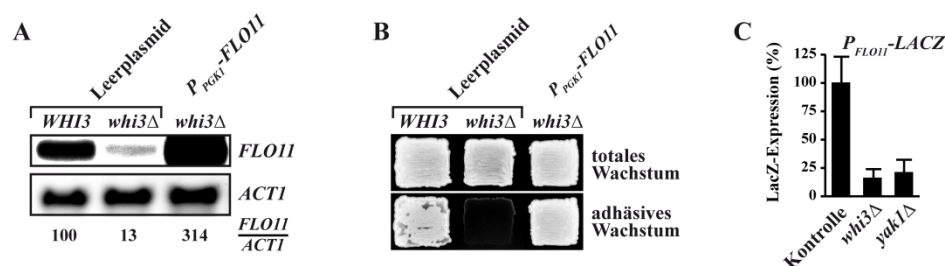


Abb. 9: Whi3 kontrolliert die Adhäsion und *FLO11*-Expression über den *FLO11*-Promotor.

(A) Um den Einfluss von *WHI3* auf die *FLO11*-Expression zu bestimmen, wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1105 (*whi3Δ*), welche das Leerplasmid B2445 oder BHUM1574 (*P_{PGK1}-FLO11*) tragen, nach dem Wachstum in YNB+Trp-Medium bis zur logarithmischen Phase einer quantitativen Northern-Analyse mit DIG-markierten *FLO11*- und *ACT1*-DNA-Sonden unterzogen. Die Zahlen geben die relativen *FLO11*-Transkriptmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* wieder und wurden für den *WHI3*-Stamm auf 100% festgesetzt. (B) Das adhäsive Wachstum der Stämme aus (A) wurde in einem Adhäsionstest nach fünftägigem Wachstum auf SC-Ura-Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen bestimmt. (C) Zur Bestimmung des Einflusses von *WHI3* auf den *FLO11*-Promotor wurde die Expression des Reportergens *LACZ* unter Kontrolle des *FLO11*-Promotors in den Hefestämmen YHUM468 (*WHI3*), YHUM1105 (*whi3Δ*) und YHUM1313 (*yak1Δ*) mit B3782 (*P_{FLO11}-LACZ*) nach Wachstum in YNB+Trp-Medium bis zur logarithmischen Phase mit Hilfe eines β -Galaktosidasetests gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen und belaufen sich auf weniger als 25%.

Um diese beiden Hypothesen zu überprüfen, wurde *FLO11* zunächst im *whi3Δ*-Hintergrund vom konstitutiv aktiven *PGK1*-Promotor exprimiert. Diese ektopische Expression resultierte in einer dreifachen Erhöhung der *FLO11*-Transkriptmenge sowie in der Wiederherstellung der Adhäsion (Abb. 9A und B). Des Weiteren sollte die Abhängigkeit des *FLO11*-Promotors von *WHI3* an Hand eines *LACZ*-Reporterkonstruktes bestimmt werden, das unter Kontrolle

des *FLO11*-Promotors steht und sowohl in An- als auch in Abwesenheit von *WHI3* exprimiert wurde. Wie erwartet zeigte der *whi3Δ*-Stamm eine deutlich reduzierte *LACZ*-Expression im Vergleich zum *WHI3*-Stamm (Kontrolle; Abb. 9C). Folglich scheint Whi3 die Expression von *FLO11* nicht über die *FLO11*-mRNA-Stabilität sondern über dessen Promotor und bisher unbekannte Faktoren zu regulieren.

2.1.2 Die Chromatinumstrukturierer Ada2 und Hst3 sind potentielle Effektoren von Whi3 zur Regulation von *FLO11*

Auf der Suche nach Effektoren von Whi3 zur Regulation des adhäsiven Wachstums wurden bereits Transkriptprofile des *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamms durchgeführt. Diese Analyse identifizierte zwei vielversprechende Gene, die an der Chromatin-Umstrukturierung beteiligt sind, *ADA2* und *HST3*. Ada2 ist Teil des ADA- und SAGA-Komplexes und fungiert als transkriptioneller Koaktivator (Brachmann et al., 1995; Sterner and Berger, 2000). *ADA2* wird in der *whi3Δ*-Mutante ca. zweifach geringer exprimiert, während das für eine Histondeacetylase kodierende *HST3* eine dreifach erhöhte mRNA-Menge aufzeigt. Ferner wird auch die Expression von *HST4*, einem Homolog von *HST3* mit redundanten Funktionen, in Abwesenheit von *WHI3* ca. 1,5-fach induziert. Da ein kausaler Zusammenhang zwischen der Histonacetylierung und Genexpression besteht (Rando and Winston, 2012), könnte die Deletion von *WHI3* zu einer verringerten Acetyldichte und somit erhöhten Chromatindichte am *FLO11*-Promotor führen, was wiederum die erniedrigten *FLO11*-Transkriptmengen im *whi3Δ*-Stamm erklären würde. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten die veränderten Transkriptmengen der beiden Gene in der *whi3Δ*-Mutante revertiert werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst *HST3* und *HST4* im *whi3Δ*-Stamm deletiert und der Effekt auf die Adhäsion sowie *FLO11*-Expression untersucht (Abb. 10). Die Einzeldelation von *HST3* im *whi3Δ*-Hintergrund führte lediglich zu einer geringen Steigerung der *FLO11*-mRNA Menge auf ca. 15%. Dieser Wert scheint jedoch noch unterhalb eines Schwellenwertes zu liegen, da der *whi3Δ hst3Δ*-Stamm im Waschtest keine signifikante Verbesserung der Adhäsion im Vergleich zur *whi3Δ*-Einzelmutante aufwies. Die zusätzliche Deletion von *HST4* resultierte in einer weiteren Verdopplung des *FLO11*-Transkriptes auf ca. 30% und einer leichten Steigerung der Adhärenz an Agarplatten. Allerdings ist die Deletion der beiden Histondeacetylases nicht ausreichend, um die Deletion von *WHI3* vollständig zu supprimieren.

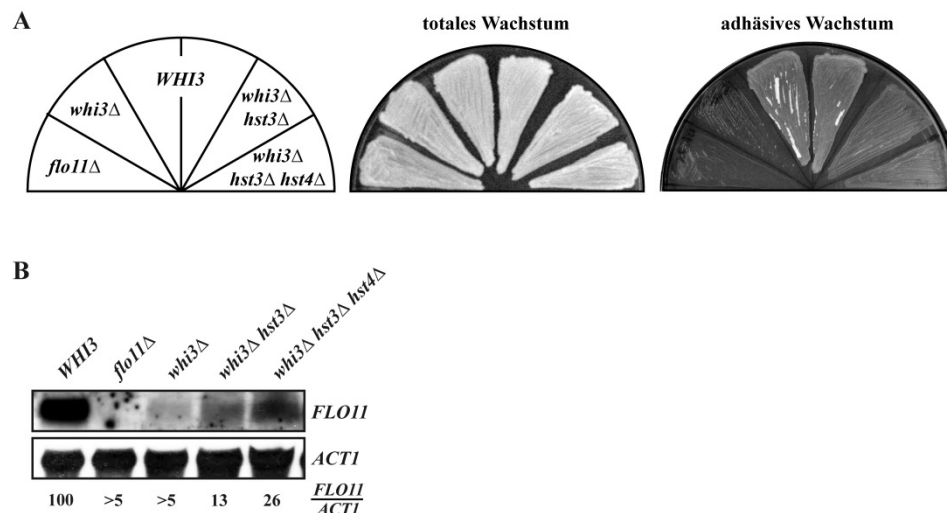


Abb. 10: Die Histondeacetylasen Hst3 und Hst4 üben einen negativen Einfluss auf das adhäsive Wachstum aus und stellen potentielle Effektoren von Whi3 dar.

(A) Zur Bestimmung des adhäsiven Wachstums in Abhängigkeit von *WHI3*, *HST3* und *HST4* wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM924 (*flo11Δ*), YHUM1105 (*whi3Δ*), YHUM1478 (*whi3Δ hst3Δ*) und YHUM1658 (*whi3Δ hst3Δ hst4Δ*) einem Adhäsionstest auf festem YEPD-Medium unterzogen. Nach fünf-tägigem Wachstum wurden die Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert. (B) Northern-Analyse der *FLO11*-Expression in den Hefestämmen aus (A) nach Wachstum in YNB+Trp-Medium bis zur logarithmischen Phase mit DIG-markierten *FLO11*- und *ACT1*-DNA-Sonden. Die Zahlen geben relative *FLO11*-Transkriptmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* an, wobei der Wert des *WHI3*-Stamms auf 100% festgelegt wurde.

Aus diesem Grund wurde *ADA2* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *PGK1*-Promotors im *WHI3*-Kontrollstamm, dem *whi3Δ*- und *whi3Δ hst3Δ hst4Δ*-Stamm überexprimiert (Abb. 11).

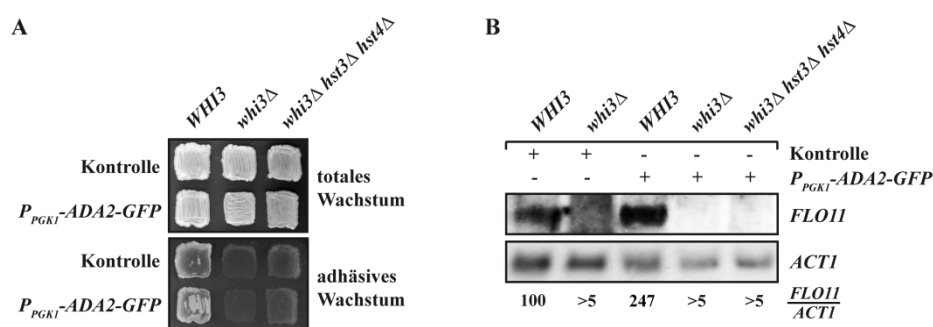


Abb. 11: Die Histonacetylase-Untereinheit Ada2 ist in der Lage die *FLO11*-Expression in Anwesenheit von *WHI3* zu induzieren.

(A) Um zu überprüfen, ob die ektopische Überexpression von *ADA2* den Adhäsionsdefekt der *whi3Δ*-Mutante supprimieren kann, wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1105 (*whi3Δ*) und YHUM1658 (*whi3Δ hst3Δ hst4Δ*) mit B1820 (Kontrolle) oder BHUM1459 (*P_{PGK1}-ADA2-GFP*) einem Waschtest auf SC-Ura-Platten unterzogen. Nach fünf-tägigem Wachstum wurden die Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert. (B) Quantitative Northern-Analyse der *FLO11*-Expression in den Stämmen aus (A) nach Wachstum in YNB+Trp-Medium bis zur logarithmischen Phase mit DIG-markierten *FLO11*- und *ACT1*-DNA-Sonden. Die Zahlen geben relative *FLO11*-Transkriptmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* an, wobei der Wert des *WHI3*-Stamms mit B1820 auf 100% gesetzt wurde.

Entgegen den Erwartungen konnte die Adhäsion jedoch in keinem der drei getesteten Stämme signifikant erhöht werden. Die *FLO11*-Transkriptanalyse der drei Stämme zeigte zunächst, dass die *FLO11* mRNA-Menge im *WHI3*-Kontrollstamm um das 2,5-fache stieg, was einen prinzipiellen Einfluss von Ada2 auf die *FLO11*-Expression bestätigt. Allerdings schien dieses Induktionspotential in der *whi3Δ*- und *whi3Δ hst3Δ hst4Δ*-Mutanten verloren zu gehen. Aus diesem Grund sollte mit Hilfe einer quantitativen Northern- und Western-Analyse untersucht werden, ob die Überexpression von *ADA2* im *whi3Δ*-Hintergrund überhaupt möglich ist (Abb. 12).

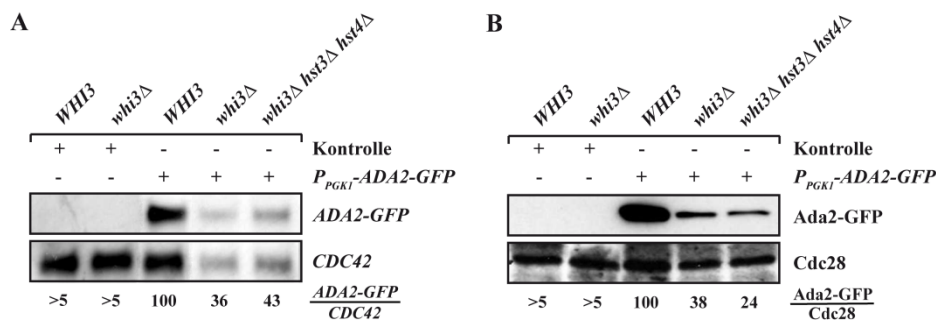


Abb. 12: Die Abwesenheit von *WHI3* verhindert die ektopische Überexpression von *ADA2*.

(A) Um den Erfolg der konstitutionellen Expression von *ADA2* in An- und Abwesenheit von *WHI3* zu überprüfen, wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1105 (*whi3Δ*) und YHUM1658 (*whi3Δ hst3Δ hst4Δ*), die entweder das Leerplasmid B1820 (Kontrolle) oder BHUM1459 (*P_{PGK1}-ADA2-GFP*) tragen, nach dem Wachstum in YNB+Trp-Medium bis zur logarithmischen Phase einer quantitativen Northern-Analyse mit DIG-markierten *ADA2*- und *CDC42*-DNA-Sonden unterzogen. Die Zahlen geben relative *ADA2*-Transkriptmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *CDC42* an, wobei der Wert von YHUM468 (*WHI3*) mit BHUM1459 auf 100% festgelegt wurde. (B) Zur Bestimmung der Ada2-GFP-Proteinmenge wurden die Stämme aus (A) außerdem einer quantitativen Western-Analyse unter Verwendung der Primärantikörper anti-GFP und anti-Cdc28 unterzogen. Die Zahlen geben relative Ada2-Proteinmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle Cdc28 an, wobei der Wert von YHUM468 (*WHI3*) mit BHUM1459 erneut auf 100% festgesetzt wurde.

Entgegen den Erwartungen sank die *ADA2*-Transkriptmenge bereits zwei- bis dreifach infolge der *WHI3*-Deletion, so dass die Ada2-Proteinmengen im *whi3Δ*- und *whi3Δ hst3Δ hst4Δ*-Stamm nur noch ca. 30% im Vergleich zum *WHI3*-Kontrollstamm betrugen (Abb. 12). Da in Abb. 9C gezeigt werden konnte, dass der *PGK1*-Promotor unabhängig von *WHI3* ist, scheint das RBP die Stabilität der *ADA2*-mRNA negativ zu beeinflussen und somit die Überexpression von *ADA2* im *whi3Δ*-Hintergrund zu unterbinden. Ungeachtet dessen deuten die hier gewonnenen Daten darauf hin, dass die Chromatinstrukturierer Ada2 und Hst3/4 in der Lage sind die *FLO11*-Expression zu beeinflussen und könnten somit potentielle Effektoren von Whi3 zur Kontrolle der Biofilmbildung darstellen.

2.1.3 Die DYRK-Kinase Yak1 supprimiert den Adhäsionsdefekt von *WHI3*-defizienten Zellen und ist ein dosisabhängiger Regulator von *FLO11*

Zur Identifizierung weiterer Effektoren von Whi3 wurde außerdem eine „High-copy“-Suppressoranalyse im *whi3Δ*-Hintergrund von Mario Malcher durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der *whi3Δ*-Stamm mit einer „High-copy“-Plasmidbibliothek transformiert und Gene gesucht, die in der Lage sind den Adhäsionsdefekt der *whi3Δ*-Mutante zu supprimieren. Entgegen den Erwartungen konnte das *FLO11*-Gen in diesem Experiment nicht isoliert werden, was darauf hindeutet, dass die Suppressoranalyse nicht gesättigt war oder die Plasmidbibliothek kein funktionelles *FLO11*-Gen enthält. Allerdings konnte dieser Test sowohl den Transkriptionsaktivator Phd1 als auch die Protein-Kinase Yak1 als potentielle Effektoren von Whi3 hinsichtlich der Adhäsion und *FLO11*-Expression identifizieren. Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf die Epistasisanalyse zwischen Whi3 und Yak1 sowie ihren Einfluss auf die Adhäsion. So führte die Überexpression von *YAK1* bereits im *WHI3*-Kontrollstamm zu einer 2,5-fachen Erhöhung der *FLO11*-Transkriptmenge bzw. der Adhäsion. Im *whi3Δ*-Stamm konnte eine vollständige Suppression der reduzierten *FLO11*-mRNA-Menge und des Adhäsionsdefektes beobachtet werden (Abb. 13; durchgeführt von Mario Malcher).

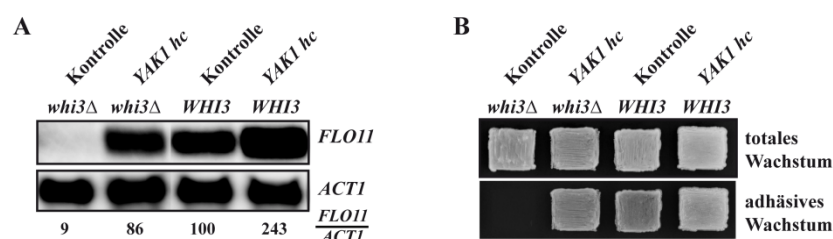


Abb. 13: Die DYRK-Kinase Yak1 ist ein dosisabhängiger Regulator von *FLO11* und supprimiert den Adhäsionsdefekt der *whi3Δ*-Mutante bei Überexpression.

(A) Um den Einfluss von *YAK1* auf die *FLO11*-Expression zu bestimmen, wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1105 (*whi3Δ*) mit dem Leerplasmid B2338 (Kontrolle) oder BHUM1058 (*P_{YAK1}-YAK1*) nach Wachstum in YNB+Trp-Medium bis zur logarithmischen Phase einer quantitativen Northern-Analyse mit DIG-markierten *FLO11*- und *ACT1*-DNA-Sonden unterzogen. Die Zahlen geben relative *FLO11*-Transkriptmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* an, wobei der Wert des *WHI3*-Stamms mit B2338 auf 100% festgelegt wurde. (B) Zur Bestimmung des adhäsiven Wachstums wurden die Stämme aus (A) einem Adhäsionstest auf festem SC-Ura-Medium unterzogen. Nach fünftägigem Wachstum wurden die Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert.

Diese Daten zeigen, dass Yak1 ein dosisabhängiger Aktivator von *FLO11* und der Biofilmbildung ist. Da die *P_{FLO11}-LACZ*-Menge im *yak1Δ*-Stamm außerdem auf ca. 25% sank

im Vergleich zum Kontrollstamm, scheint Yak1 ähnlich wie Whi3 die Transkription von *FLO11* zu regulieren (Abb. 9C).

2.1.4 Whi3 kontrolliert die DYRK-Kinase Yak1 auf posttranskriptioneller Ebene

Um weiterhin zu bestätigen, dass Yak1 ein echter Effektor von Whi3 ist und nicht nur einen „Bypass“-Suppressor darstellt, wurde der Einfluss von *WHI3* auf die mRNA- und Proteinmengen von N- bzw. C-terminalen Yak1-Fusionskonstrukten (*GFP-YAK1* bzw. *YAK1-3HA*) untersucht (Abb. 14).

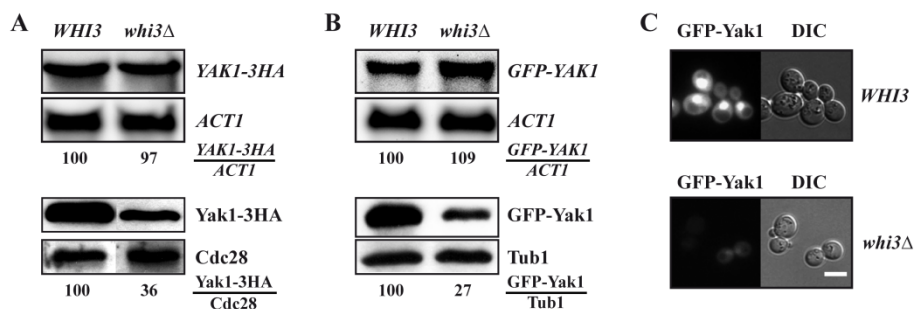


Abb. 14: Whi3-vermittelte posttranskriptionelle Regulation von *YAK1*.

(A) Um den Einfluss von *WHI3* auf *YAK1* zu bestimmen, wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1105 (*whi3Δ*) mit dem Plasmid BHUM1117 (*P_{YAK1}-YAK1-3HA*) nach dem Wachstum in YNB+Trp-Medium bis zur logarithmischen Phase einer quantitativen Northern- (oben) und Western-Analyse (unten) mit DIG-markierten *FLO11*- und *ACT1*-DNA-Sonden bzw. den Primärantikörpern anti-HA und anti-Cdc28 unterzogen. Die Zahlen geben relative *YAK1-3HA*-Transkript- bzw. Yak1-3HA-Proteinmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* bzw. Cdc28 an, wobei der jeweilige Wert des *WHI3*-Stamms auf 100% gesetzt wurde. (B) Analog zu (A) wurden quantitative Northern- (oben) und Western-Analysen der Hefestämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1105 (*whi3Δ*) mit BHUM1119 (*P_{YAK1}-GFP-YAK1*) mit DIG-markierten *YAK1*- und *ACT1*-DNA-Sonden bzw. den Primärantikörpern anti-GFP und anti-Tubulin durchgeführt. (C) Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Stämme aus (B) nach Wachstum bis zur logarithmischen Phase in LFM+Trp-Medium zur Lokalisationsbestimmung von GFP-Yak1. Die Stämme wurden fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregung von 395 nm (GFP-Yak1) und mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) untersucht. Der Referenzbalken entspricht 5 μ m.

Während die Transkriptmengen beider Fusionskonstrukte keine Abhängigkeit von *WHI3* aufwiesen, sanken die Proteinmengen der Yak1-Fusionen signifikant auf ca. 30% im *whi3Δ*-Hintergrund. Diese posttranskriptionelle Regulation von Yak1 durch Whi3 bestätigt die Hypothese, dass Yak1 tatsächlich einen Effektor von Whi3 darstellt. Da Yak1 ferner unter Glukosemangel vom Cytoplasma in den Nukleus transloziert, sollte außerdem untersucht werden, ob Whi3 neben der Proteinmenge auch die Lokalisation von GFP-Yak1 reguliert. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da das Fusionsprotein sowohl in An- als auch Abwesenheit von *WHI3* im Kern akkumulierte. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse

darauf hin, dass Whi3 und die Proteinkinase Yak1 innerhalb einer Signalkaskade liegen, um die *FLO11*-Expression und Adhäsion zu regulieren.

2.1.5 Whi3 und Yak1 koregulieren Gene der zellulären Hitzeantwort

Einen weiteren Hinweis für eine Whi3-Yak1-vermittelte Signalweiterleitung lieferten die Whi3- und Yak1-Transkriptanalysen, in denen die differentielle Genexpression zwischen dem *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamm bzw. einem Stamm, der Yak1 überexprimiert, und der *yak1Δ*-Mutante verglichen wurde (Abb. 15; Yak1-„Array“ wurde von Mario Malcher durchgeführt).

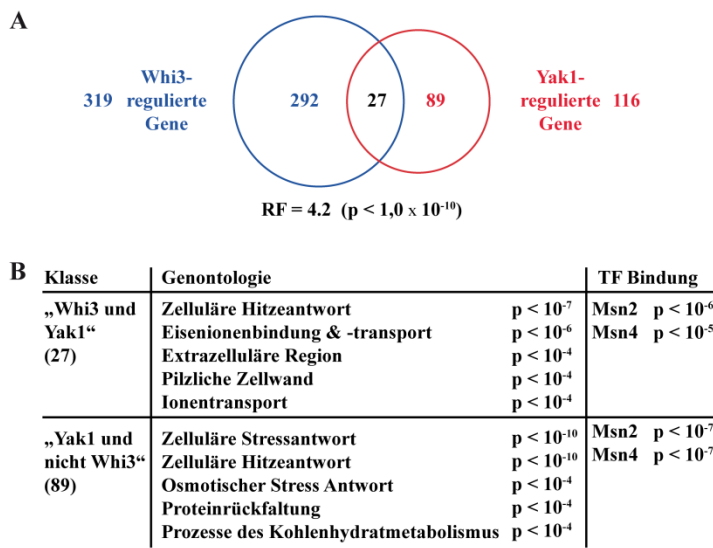


Abb. 15: Identifizierung von Whi3- bzw. Yak1-regulierten Genen mit Hilfe von genomweiten Transkriptanalysen.

(A) Das Venn-Diagramm zeigt die Anzahl der mindestens zweifach differentiell exprimierten Gene in den Hefestämmen YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1920 (*whi3Δ*) (blau) bzw. in YHUM1313 (*yak1Δ*) mit dem Leerplasmid B2338 oder BHUM1058 (*P_{YAK1}-YAK1*, 2μ) (rot) sowie die Anzahl der überlappenden Gene. Des Weiteren sind der Repräsentationsfaktor (RF), der die Anzahl von gemeinsam regulierten Genen bei zufälliger Probennahme berechnet, und die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) für eine Schnittmengengröße von 27 unter den vorliegenden Bedingungen angegeben. (B) Die beiden Genklassen „Whi3- und Yak1-“ regulierter sowie „Yak1- und nicht Whi3-“ regulierter Gene wurden einer Genontologie- (GO-) Analyse mit Hilfe des Ceres-Servers (Morris *et al.*, 2010) unterzogen, um Prozesse zu identifizieren, die statistisch signifikant durch Whi3 und/oder Yak1 reguliert werden ($p < 10^{-4}$). Die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) für die Anreicherung der jeweiligen Prozesse ist angegeben. Außerdem wurden mit der Ceres-Software Transkriptionsfaktoren (TF) gesucht, die statistisch überrepräsentierte Bindestellen in den Promotoren (bis zu 1000 bp) der beiden Genklassen aufweisen ($p < 10^{-4}$). Die Wahrscheinlichkeiten für eine solche Anreicherung bei zufällig ausgewählten Genen wurde ebenfalls berechnet. Die Yak1-Transkriptprofile wurden von Mario Malcher durchgeführt.

Dabei wurde zur Untersuchung der Yak1-abhängigen Gene ein Yak1-überexprimierender Stamm gewählt, da die Proteinkinase ein dosisabhängiger Regulator von *FLO11* und der Adhäsion ist und zudem unter nährstofflimitierenden Bedingungen stark induziert wird (Garrett *et al.*, 1991). Da das bisher verfügbare *whi3Δ*-Transkriptprofil von Mario Malcher

unwissentlich mit einer Mischkultur aus haploiden und diploiden *whi3Δ*-Zellen hergestellt wurde (siehe Kapitel 2.4), wurden in dieser Arbeit erneut Transkriptprofile mit *WHI3*- und *whi3Δ*-Stämmen durchgeführt. Die mindestens zweifach differentiell exprimierten Gene wurden in funktionell annotierte Kategorien (Genontologie-Gruppen, GO-Gruppen) mit Hilfe der Internet-basierten Software Ceres (Morris et al., 2010) eingeordnet ($p < 10^{-4}$), um biologische Prozesse zu identifizieren, die von Whi3 bzw. Yak1 reguliert werden. Außerdem wurden Transkriptionsfaktoren gesucht, deren Bindestellen an den Promotoren dieser Gene (bis zu 1000 bp stromaufwärts) angereichert sind und somit potentielle Effektoren von Whi3 und Yak1 darstellen könnten. Es wurden sowohl experimentell validierte als auch bioinformatisch vorausgesagte Transkriptionsfaktorbindestellen berücksichtigt. Da die Transkriptprofile des *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamms erst in Kapitel 2.4.6 näher ausgewertet werden, beschränkt sich die Analyse dieses Kapitels auf „Yak1- und Whi3-“ bzw. „Yak1- und nicht Whi3-“ regulierte Gene. Das Venn-Diagramm zeigt, dass Whi3 und Yak1 eine statistisch signifikante Anzahl von 27 Genen gemeinsam regulieren, was unser Modell weiterhin bestätigt, dass beide Proteine innerhalb einer Signalkaskade agieren. Die hohe Signifikanz dieser Koregulation wird an Hand des Repräsentationsfaktors von 4,2 (Maß für die tatsächliche Schnittmengengröße in Relation zur erwarteten) und einer Wahrscheinlichkeit von $1,0 \times 10^{-10}$ deutlich. Das koregulierte Gencluster enthält *FLO11* und *GPG1*, das für die γ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins zur Regulation des adhäsiven Wachstums kodiert, sowie fünf weitere Gene, deren Deletion zu einer Verminderung der Adhäsion führen (*FIT2*, *FIT3*, *HXT4*, *HSP12*, *YRO2*) und *HPF1*, dessen Überexpression eine verstärkte Adhäsion hervorruft. Interessanter Weise lokalisieren mit Ausnahme von Yro2 alle diese Proteine in der Zellwand bzw. Zellmembran. Allerdings ist die genaue Funktion dieser sechs Gene während des adhäsiven Wachstums noch weitestgehend unverstanden. Das Fehlen von weiteren Schlüsselfaktoren der Biofilmbildung, die den Adhäsionsverlust der *whi3Δ*- bzw. *yak1Δ*-Mutante erklären könnten, deutet darauf hin, dass Whi3 und Yak1 eventuell einen posttranskriptionellen Einfluss auf solche Faktoren ausüben könnten. Interessanter Weise zeigt das „Whi3- und Yak1-“ regulierte Gencluster eine Anreicherung für Gene der zellulären Hitzeantwort sowie der Zellwand wie z. B. *HSP12* und *PIR3*, die für die Stabilität der Zellwand bzw. Membran unter diversen Stressbedingungen benötigt werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass Whi3 und Yak1 generell in die Stressantwort und zusätzlich eventuell an der Zellwandstabilität infolge von Stress beteiligt sein könnten. Eine solche Regulation könnte z. B. über die stress-induzierten Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 erfolgen, die

eine Anreicherung an den „Whi3- und Yak1-“ regulierten Genen zeigen und bereits in vorherigen Arbeiten als Effektoren von Yak1 beschrieben worden sind (Lee et al., 2008).

Das „Yak1- und nicht-Whi3-“ regulierte Gencluster enthält weitere Gene der Hitze- und generellen Stressantwort sowie Gene der Proteinrückfaltung, was darauf hindeutet, dass Yak1 auch unabhängig von Whi3 in die Stressantwort involviert sein könnte. Diese Regulation könnte ebenfalls über die Stress-induzierten Transkriptionsfaktoren Msn2/4 erfolgen, die eine signifikante Anreicherung an den Promotoren dieser Gengruppe zeigen.

2.1.6 Whi3 und Yak1 werden für die *FLO11*-Induktion unter Hitzestress und Glukosemangel benötigt

Da Whi3 und Yak1 in der hier angefertigten Transkriptanalyse mit der Hitzeantwort bzw. generellen Stressantwort in Verbindung gebracht wurden, sollte untersucht werden, ob beide Proteine auch an der *FLO11*-Induktion infolge diverser Stressbedingungen beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurde die *FLO11*-Transkriptmenge in An- und Abwesenheit von *WHI3* bzw. *YAK1* unter normalen und den folgenden Stressbedingungen gemessen: in Anwesenheit von 3-Aminotriazol (3AT), Rapamycin (R), unter Glukosemangel (0,1% Glc), in Anwesenheit von Saccharose (Sacch) sowie bei 37 °C (Abb. 16). Zur Simulation von Aminosäure- bzw. Histidinmangel wurden der *WHI3*- (Kontrolle), *whi3Δ*- und *yak1Δ*-Stamm in Gegenwart von 3AT angezogen (Abb. 16A). Wie erwartet führte 3AT bereits im Kontrollstamm zu einer sechsfachen Erhöhung der *FLO11*-mRNA-Menge (Braus et al., 2003) und einem ähnlichen Anstieg in der *whi3Δ*-Mutante. Im *yak1Δ*-Hintergrund konnte sogar eine 30-fache Induktion der *FLO11*-Expression beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass Yak1 die Wahrnehmung von Aminosäuremangel eher negativ beeinflusst und dabei unabhängig von Whi3 agiert. Rapamycin ist ein weiterer bekannter Induktor der *FLO11*-Expression. Sowohl der *WHI3*- als auch der *whi3Δ*-Stamm weisen eine ca. zweifache Steigerung des *FLO11*-Transkriptes nach Rapamycingabe auf, so dass Whi3 nicht an der Weiterleitung dieses Signal beteiligt zu sein scheint (Abb. 16B). Der Einfluss auf Yak1 wurde nicht untersucht. Des Weiteren wurde das Induktionspotential verschiedener Zucker in Abhängigkeit von Whi3 und Yak1 gemessen. Dabei führten im *WHI3*-Kontrollstamm sowohl die Anwesenheit von Saccharose als auch Glukosemangel (0,1% Glc) im Einklang mit früheren Daten zu einem signifikanten Anstieg des *FLO11*-Transkriptes (Abb. 16A und B) (Kuchin et al., 2002; Van de Velde and Thevelein, 2008). Auch in der *whi3Δ*-Mutante konnte eine ca. zweifache Zunahme

der *FLO11*-mRNA-Menge in Saccharose-haltigem Medium beobachtet werden (die Abhängigkeit von Yak1 wurde für diese Bedingung nicht getestet).

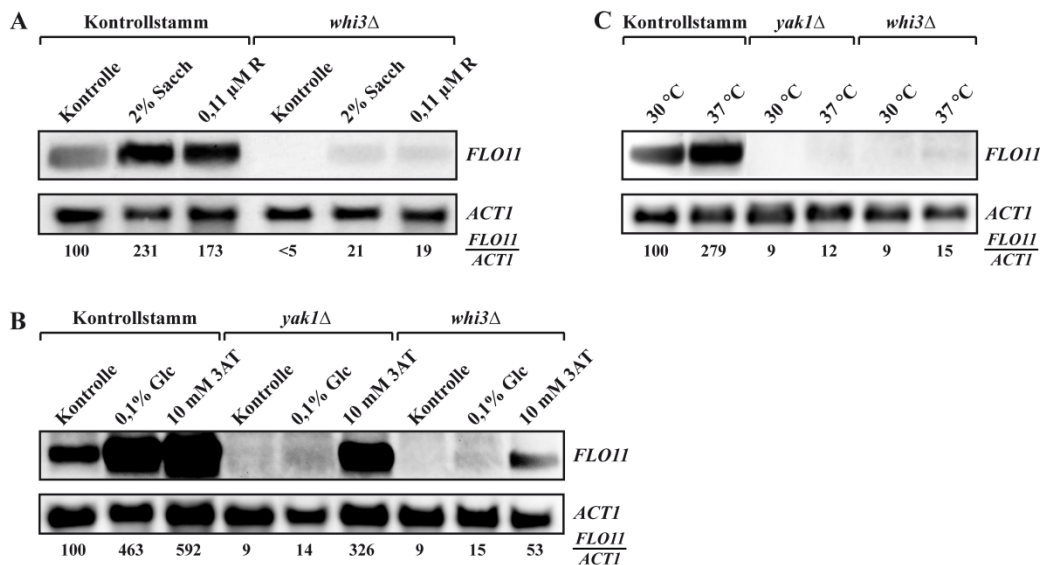


Abb. 16: Whi3 und Yak1 sind für die *FLO11*-Induktion infolge von Hitzestress und Glukosemangel nötig.

(A) Quantitative Northern-Analyse zur Bestimmung der *FLO11*-Induktion in Abhängigkeit von *WHI3* und *YAK1* unter verschiedenen Stressbedingungen. Nach Erreichen der logarithmischen Phase in YNB+Trp+Ura-Medium wurden die Hefestämme YHUM468 (Kontrollstamm) und YHUM1105 (*whi3Δ*) für weitere drei Stunden unter Kontrollbedingungen (2% Glc) oder in Anwesenheit von 2% Saccharose bzw. 2% Glukose mit 0,11 µM Rapamycin kultiviert. Die Transkriptdetektion erfolgte mit DIG-markierten *FLO11*- und *ACT1*-DNA-Sonden. Die Zahlen stellen relative *FLO11*-Transkriptmengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* dar, wobei der Wert von YHUM468 unter Kontrollbedingungen auf 100% festgelegt wurde. (B) Analog zu (A) wurden die Hefestämme YHUM468 (Kontrollstamm), YHUM1105 (*whi3Δ*) und YHUM1313 (*yak1Δ*) außerdem unter Kontrollbedingungen (2% Glc), Glukose-limitierenden Bedingungen (0,1% Glc) oder unter Aminosäuremangel-ähnlichen Bedingungen (10 mM 3AT) inkubiert und anschließend hinsichtlich der *FLO11*-Expression in einer quantitativen Northern-Analyse untersucht. (C) Ferner wurden die Stämme aus (B) nach Erreichen der logarithmischen Phase für eine weitere Stunde bei 30 °C (Kontrolle) oder 37 °C (Hitzestress) kultiviert. Die Auswertung erfolgte analog zu (A). (B) und (C) durchgeführt von Mario Malcher.

Dahingegen schien die Deletion von *WHI3* bzw. *YAK1* die *FLO11*-Induktion infolge von Glukosemangel komplett zu verhindern, was darauf schließen lässt, dass unter Glukosemangel beide Gene für die ausreichende Expression des Oberflächenflokkulins benötigt werden. Abschließend wurde die *FLO11*-Expression infolge von Hitzestress in An- und Abwesenheit von *WHI3* bzw. *YAK1* untersucht (Abb. 16C). Während der Kontrollstamm eine ca. dreifache Induktion der *FLO11*-mRNA nach Wachstum bei 37 °C zeigte, ging diese Regulation nach Deletion von *WHI3* bzw. *YAK1* verloren. Folglich werden auch hier beide Proteine für die vollständige Expression von *FLO11* unter Hitzestress benötigt.

Zusammenfassend zeigen die hier erhaltenen Daten, dass sowohl Whi3 als auch Yak1 unerlässlich für die *FLO11*-Expression unter Glukosemangel und Hitzestress sind, während

Yak1 die Expression von *FLO11* in Anwesenheit von 3AT eher negativ zu beeinflussen scheint. Dahingegen werden Stressbedingungen wie das Wachstum in Anwesenheit von Saccharose oder Rapamycin unabhängig von Whi3 oder Yak1 weitergeleitet.

2.1.7 Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf Whi3 und Yak1

Anschließend sollte überprüft werden inwiefern die einzelnen Stressbedingungen Whi3 und Yak1 selbst beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden die Proteinmengen sowie die Lokalisation von Whi3-GFP und GFP-Yak1 unter den jeweiligen Stressbedingungen verfolgt (Abb. 17 und 18).

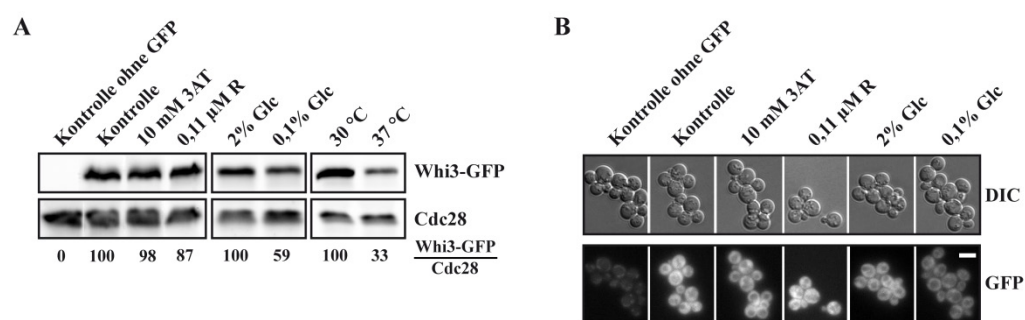


Abb. 17: Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die Expression und Lokalisation von Whi3.

(A) Quantitative Western-Analyse zur Bestimmung der Whi3-Menge unter verschiedenen Stressbedingungen. Der Hefestamm YHUM1627 (*WHI3-GFP*) wurde nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura bis zur logarithmischen Phase entweder unter den jeweiligen Kontrollbedingungen (Kontrolle, 2% Glc, 30 °C) inkubiert oder verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt: Aminosäuremangel-ähnliche Bedingungen (10 mM 3AT), 0,11 μ M Rapamycin, Glukosemangel (0,1% Glc) oder Hitzestress (37 °C). Die anschließende Proteinanalyse wurde mit Hilfe der Primärantikörper anti-GFP und anti-Cdc28 durchgeführt. Die Zahlen geben die relativen Whi3-GFP-Mengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle Cdc28 an, wobei die Werte der jeweiligen Kontrollen auf 100% gesetzt wurden. (B) Die Lokalisation von Whi3-GFP in YHUM1627 unter den jeweiligen Stressbedingungen aus (A) wurde mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregung von 395 nm (GFP) untersucht. Der Referenzbalken entspricht 5 μ M.

Den Erwartungen entsprechend wurde infolge von 3AT- oder Rapamycingabe keine signifikante Änderung der Proteinkonzentration oder Lokalisation von Whi3 bzw. Yak1 beobachtet (Abb. 17, 18A und C); der Rapamycineinfluss auf Yak1 wurde nicht gemessen. Dies korreliert mit der oben gewonnenen Erkenntnis, dass Whi3 nicht an der *FLO11*-Induktion durch 3AT oder Rapamycin beteiligt sind. Glukosemangel führte jedoch überraschender Weise zu einem Absinken der Whi3-Proteinmenge auf ca. 60%, während die Lokalisation des Fusionsproteins nicht beeinflusst wurde (Abb. 17). Im Gegensatz dazu stiegen die Yak1-Proteinmenge ca. zweifach und die *YAK1*-mRNA-Menge ca. 1,5-fach infolge der Glukoselimitation (Abb. 18A und B).

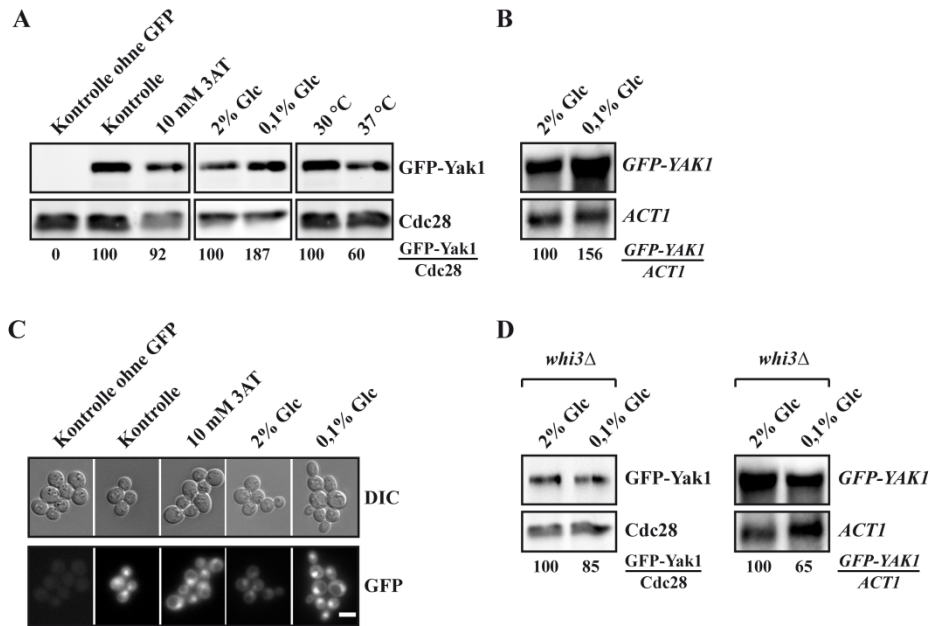


Abb. 18: Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die Expression und Lokalisation von Yak1.

(A) Quantitative Western-Analyse zur Bestimmung der Yak1-Menge unter verschiedenen Stressbedingungen. Der Hefestamm YHUM468 (*WHI3*) mit BHUM1119 (*P_{YAK1}-GFP-YAK1*) wurde nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura bis zur logarithmischen Phase entweder unter den jeweiligen Kontrollbedingungen (Kontrolle, 2% Glc, 30 °C) inkubiert oder verschiedenen Stresssituationen ausgesetzt: Aminosäuremangel-ähnliche Bedingungen (10 mM 3AT), Glukosemangel (0,1% Glc) oder Hitzestress (37 °C). Die anschließende Proteinanalyse wurde mit Hilfe der Primärantikörper anti-GFP und anti-Cdc28 durchgeführt. Die Zahlen geben die relativen GFP-Yak1-Mengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle Cdc28 an, wobei die Werte der jeweiligen Kontrollen auf 100% gesetzt wurden. (B) Quantitative Northern-Analyse ausgewählter Bedingungen aus (A) mit DIG-markierten *YAK1*- und *ACT1*-DNA-Sonden. Die Zahlen geben relative *GFP-YAK1*-mRNA-Mengen nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* an, wobei die Werte unter Kontrollbedingungen auf 100% festgelegt wurden. (C) Die Lokalisation von GFP-Yak1 in YHUM468 mit BHUM1119 unter den jeweiligen Stressbedingungen aus (A) wurde mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregung von 395 nm (GFP) untersucht. Der Referenzbalken entspricht 5 µm. (D) Um die Auswirkungen von Glukosemangel auf die GFP-Yak1-Expression im *whi3Δ*-Hintergrund zu untersuchen, wurde der Hefestamm YHUM1105 (*whi3Δ*) mit BHUM1119 (*P_{YAK1}-GFP-YAK1*) analog zu (A) unter Kontrollbedingungen (2% Glc) sowie in Gegenwart von 0,1% Glukose analysiert. Die quantitativen Northern- und Western-Analysen der *GFP-YAK1*-mRNA bzw. des GFP-Yak1-Proteins wurden wie in (A) und (B) beschrieben durchgeführt.

In Übereinstimmung mit früheren Daten akkumulierte das Yak1-Fusionsprotein infolge von Glukosemangel im Kern (Moriya and Shimizu-Yoshida, 2001). Des Weiteren wurde der Effekt von Hitzestress auf Whi3 und Yak1 untersucht. Entgegen den Erwartungen sanken die Proteinmengen auf 30% für Whi3 und 60% für Yak1 (Abb. 17A und 18A). Die Lokalisation der beiden Proteine wurde nicht untersucht.

Da Whi3 die Proteinkinase Yak1 posttranskriptionell reguliert, sollte außerdem untersucht werden, ob die Änderung der Yak1-Proteinmengen infolge der Stressbedingungen von *WHI3* abhängen. Zu diesem Zweck wurden die Yak1-Proteinmenge und -Lokalisation im *whi3Δ*-Hintergrund unter den jeweiligen Stressbedingungen untersucht. Beide Parameter wurden

jedoch unter den meisten Bedingungen nicht durch die Abwesenheit von *WHI3* beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dahingegen konnte im *whi3Δ*-Stamm keine Induktion der *YAK1*-Transkript- oder Yak1-Proteinmenge infolge von Glukosemangel mehr beobachtet werden. Vielmehr sank v. a. die Yak1-Proteinmenge infolge des Glukosemangels auf 65% im *whi3Δ*-Hintergrund. Das GFP-Yak1-Fusionsprotein akkumulierte jedoch auch im *whi3Δ*-Stamm weiterhin im Kern (Abb. 18D). Diese Ergebnisse deuten zum einen darauf hin, dass Whi3 zumindest unter Glukosemangel in der Lage ist die Proteinkinase Yak1 auch auf transkriptioneller Ebene zu regulieren. Ferner wird der posttranskriptionelle Einfluss von Whi3 auf Yak1 v. a. unter dieser Stressbedingung benötigt, um ausreichende Yak1-Proteinmengen zu gewährleisten.

Zusammenfassend scheinen die Proteinmengen von Whi3 und Yak1 lediglich infolge von Hitzestress oder eines Glukosemangels signifikant beeinflusst zu werden. Dabei führt Hitzestress zu einem generellen Absinken der Whi3- und Yak1-Proteinmengen. Im Gegensatz dazu konnten unter Glukose-limitierenden Bedingungen zwar ähnliche Ergebnisse für Whi3 erlangt werden, allerdings weist die Yak1-Proteinmenge eine ca. zweifache Induktion in Abhängigkeit von *WHI3* auf.

2.1.8 Whi3 kontrolliert zahlreiche Schlüsselregulatoren der Adhäsion auf posttranskriptioneller Ebene

Weitere Daten weisen darauf hin, dass Whi3 auch durch Yak1-unabhängige Mechanismen die *FLO11*-Expression und Adhäsion steuert. So zeigen *whi3Δ*-Mutanten z. B. einen schweren Adhäsionsdefekt, obwohl die Yak1-Proteinmenge nur auf 1/3 im Vergleich zum *WHI3*-Stamm sinkt. Des Weiteren resultiert die Überexpression des Transkriptionsfaktors Haa1 in der vollständigen *FLO11*-Induktion im *yak1Δ*-Hintergrund, während sie im *whi3Δ*-Stamm nur zu einer partiellen Suppression führt (Malcher et al., 2011). Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob Whi3 weitere Regulatoren der Adhäsion und Differenzierung auf posttranskriptioneller Basis kontrolliert. Unter den getesteten Kandidaten befanden sich Komponenten des cAMP-/PKA-Signalweges (Tpk1, Yak1, Phd1, Tpk2, Flo8), der Kss1-/MAPK-Kaskade (Tec1) sowie das RBP Mpt5. Der Einfluss von Whi3 auf Yak1 wurde hier erneut untersucht, da vorherige Daten mit Plasmid-basierten Konstrukten gewonnen worden sind. Des Weiteren wurde der Transkriptionsrepressor Mig2 in die Untersuchung miteinbezogen, da dessen mRNA stark durch Whi3 *in vivo* gebunden wird (Colomina et al., 2008). Zur Bestimmung des posttranskriptionellen Einflusses von Whi3 wurden die einzelnen

Gene analog zu Janke (2004) genomisch, C-terminal mit *GFP* im *WHI3*- und *whi3Δ*-Hintergrund markiert und anschließend einem Adhäsionstest sowie Transkript- und Proteinanalysen unterzogen. Um zu gewährleisten, dass der *GFP-ORF* selbst nicht durch *Whi3* kontrolliert wird und die *Whi3*-vermittelte Regulation der Kandidatengene beeinflusst, wurden außerdem ein *WHI3*- und ein *whi3Δ*-Kontrollstamm generiert, in denen *GFP* direkt hinter den *MIG2*-Promotor ins Genom integriert wurde (*P_{MIG2}-GFP*). Diese beiden Stämme wurden ebenfalls in die Analysen mit eingeschlossen. Im Adhäsionstest adhärierte der *WHI3*-Ausgangsstamm wie erwartet auch nach stringentem Waschen stark an der Agarplatte, während sich der *whi3Δ*-Ausgangsstamm vollständig von der Platte löste (Abb. 19).

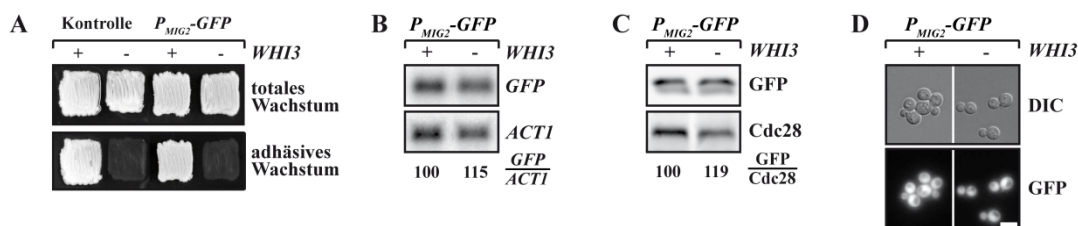


Abb. 19: Bestimmung der Abhängigkeit des *GFP-ORFs* von *WHI3*.

(A) Um den Einfluss von *WHI3* auf *GFP* zu bestimmen, wurden die Kontrollstämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1920 (*whi3Δ*) sowie die Hefestämme mit *P_{MIG2}-GFP* YHUM2221 (*P_{MIG2}-GFP*, *WHI3*) und YHUM2222 (*P_{MIG2}-GFP*, *whi3Δ*) einem Adhäsionstest an YEPD-Agarplatten unterzogen. Nach fünftägigem Wachstum bei 30 °C wurden die Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert. (B) und (C) Die Hefestämme mit *P_{MIG2}-GFP* aus (A) wurden nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium außerdem einer quantitativen Northern- (B) und Western-Analyse (C) mit radioaktiv markierten *GFP*- und *ACT1*-DNA-Sonden bzw. mit den Primärantikörpern anti-GFP und anti-Cdc28 unterzogen. Die Zahlen geben relative *GFP*-Transkript- bzw. -Proteinwerte nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* bzw. Cdc28 an, wobei die Werte des *WHI3*-Stamms auf 100% festgelegt wurden. (D) Die Stämme aus (B) wurden nach dem Wachstum in LFM+Trp+Ura ferner mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregung von 395 nm (*GFP*) untersucht. Der Referenzbalken entspricht 5 µm.

Die *P_{MIG2}-GFP*-Stämme zeigten eine vergleichbare Haftfähigkeit wie ihre jeweiligen Ausgangsstämme, was darauf schließen lässt, dass die Deletion von *MIG2* keinen Einfluss auf die Adhäsion hat und *MIG2* folglich nicht signifikant zur Regulation des adhäsiven Wachstums beiträgt. Darüber hinaus scheint die Integration des *GFP-ORFs* keinen generellen Einfluss auf dieses Entwicklungsprogramm auszuüben. Auch in den Northern- und Western-Analysen konnten keine signifikanten Abhängigkeiten der *GFP*-Transkript- oder *GFP*-Proteinmenge von *Whi3* beobachtet werden (Abb. 19). Folglich stellt die Markierung mit *GFP* eine valide Möglichkeit dar, die posttranskriptionelle Regulation von Kandidatengenen durch *Whi3* zu untersuchen.

Die C-terminal markierten Kandidatengene wurden daraufhin zunächst hinsichtlich ihrer Funktionalität im Waschtest überprüft (Abb. 20).

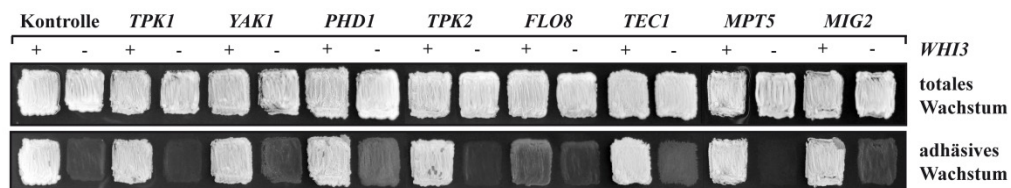


Abb. 20: Funktionalitätsanalyse der GFP-markierten Regulatoren der Zelldifferenzierung mit Hilfe eines Adhäsionstests.

Um die Funktionalität der markierten Kandidatengene *TPK1*, *YAK1*, *PHD1*, *TPK2*, *FLO8*, *TEC1*, *MPT5* und *MIG2* zu überprüfen, wurden die Kontrollstämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1920 (*whi3Δ*) sowie die Hefestämme mit den vollständigen GFP-Fusionen YHUM2045 (*TPK1-GFP*, *WHI3*), YHUM2046 (*TPK1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1755 (*YAK1-GFP*, *WHI3*), YHUM1757 (*YAK1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM2041 (*PHD1-GFP*, *WHI3*), YHUM2042 (*PHD1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1937 (*TPK2-GFP*, *WHI3*), YHUM1939 (*TPK2-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1886 (*FLO8-GFP*, *WHI3*), YHUM1935 (*FLO8-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1745 (*TEC1-GFP*, *WHI3*), YHUM1746 (*TEC1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1885 (*MPT5-GFP*, *WHI3*), YHUM1932 (*MPT5-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1884 (*MIG2-GFP*, *WHI3*) und YHUM1929 (*MIG2-GFP*, *whi3Δ*) einem Adhäsionstest an YEPD-Agarplatten unterzogen. Nach fünftägigem Wachstum bei 30 °C wurden die Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert.

Die GFP-Markierung im *WHI3*-Hintergrund resultierte mit Ausnahme von *FLO8-GFP* in vollständig funktionellen Fusionen, da die entsprechenden Stämme ähnlich stark wie der *WHI3*-Ausgangsstamm adhärten. Der *FLO8-GFP*-Stamm hingegen zeigte eine leichte Verringerung der Adhäsionsfähigkeit, was auf eine partielle Inhibierung der Flo8-Funktionen durch die GFP-Markierung hindeutet. Das Haftvermögen der markierten *whi3Δ*-Stämme war ebenfalls mit dem des *whi3Δ*-Ausgangsstamms vergleichbar. Lediglich die *PHD1*-Markierung schien zu einer geringfügigen Erhöhung der Adhärenz zu führen. Da Phd1 jedoch als positiver Regulator von *FLO11* beschrieben wurde, könnte die Markierung mit *GFP* zu einer Steigerung des *FLO11*-Induktionspotentials von Phd1 geführt haben, indem GFP z. B. die Interaktion mit Phd1-Inhibitoren verhindert (Gimeno and Fink, 1994). Indes wurden die GFP-markierten *WHI3*- und *whi3Δ*-Stämme anschließend einer quantitativen Transkript- und Proteinanalyse unterzogen (Abb. 21A). Betrachtet man zunächst den Einfluss von *WHI3* auf die Transkriptmengen der Kandidatengene, so fällt auf, dass die Deletion von *WHI3* lediglich *PHD1*, *TEC1* und *MIG2* signifikant (> 20%) beeinflusste, da die entsprechenden Transkripte im *whi3Δ*-Hintergrund um 20% bis 40% stiegen.

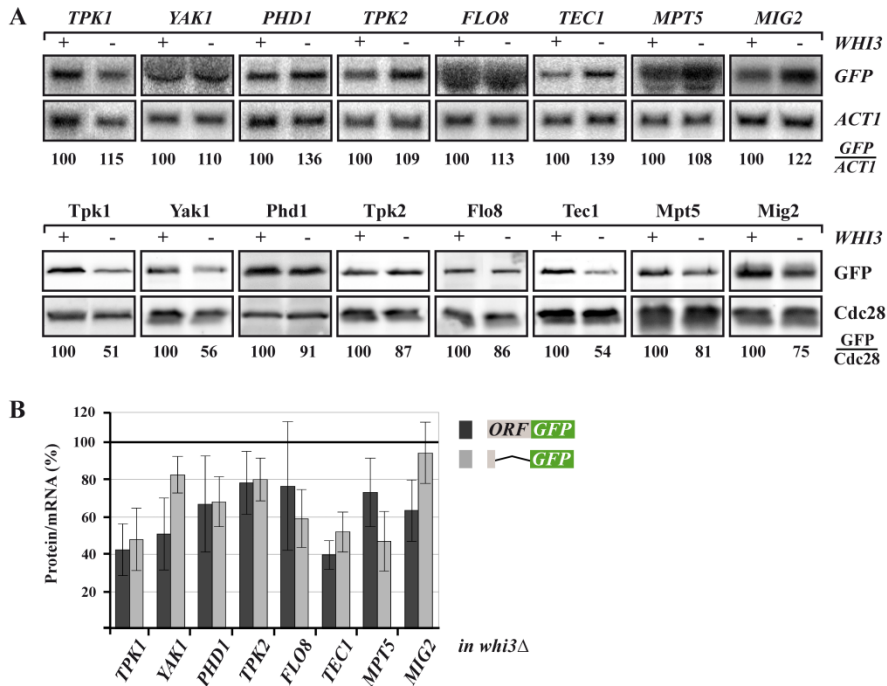


Abb. 21: Posttranskriptioneller Einfluss von *WHI3* auf verschiedene Schlüsselregulatoren der Adhäsion und Zellentwicklung.

(A) Um den Einfluss von *WHI3* auf die Transkript- und Proteinmengen ausgewählter genomischer *GFP*-Fusionskonstrukte zu ermitteln, wurden die Hefestämme YHUM2045 (*TPK1-GFP*, *WHI3*), YHUM2046 (*TPK1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1755 (*YAK1-GFP*, *WHI3*), YHUM1757 (*YAK1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM2041 (*PHD1-GFP*, *WHI3*), YHUM2042 (*PHD1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1937 (*TPK2-GFP*, *WHI3*), YHUM1939 (*TPK2-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1886 (*FLO8-GFP*, *WHI3*), YHUM1935 (*FLO8-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1745 (*TEC1-GFP*, *WHI3*), YHUM1746 (*TEC1-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1885 (*MPT5-GFP*, *WHI3*), YHUM1932 (*MPT5-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1884 (*MIG2-GFP*, *WHI3*) und YHUM1929 (*MIG2-GFP*, *whi3Δ*) nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase quantitativen Northern- (oben) und Western-Analysen (unten) mit radioaktiv markierten *GFP*- und *ACT1*-DNA-Sonden bzw. den Primärantikörpern anti-GFP und anti-Cdc28 unterzogen. Die Zahlen geben die relativen Transkript- bzw. Proteinmengen der *GFP*-Fusionskonstrukte nach Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* bzw. Cdc28 an, wobei die Werte für den jeweiligen *WHI3*-Stamm auf 100% festgelegt wurden. (B) Zur besseren Übersicht über die posttranskriptionelle Regulation durch *WHI3* wurden die relativen mRNA- und Proteinwerte der *whi3Δ*-Stämme aus (A) nach der Normalisierung mit den jeweiligen *WHI3*-Stämmen zu einem Quotienten zusammengefasst (Protein/mRNA). Neben den kompletten Fusionskonstrukten (*ORF-GFP*) wurden außerdem die Ergebnisse der Hefestämme aus Abb. 23 eingefügt, die verkürzte *GFP*-markierte Fusionskonstrukte tragen (*ORF¹⁻⁹⁹-GFP*). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei bis fünf unabhängigen Transkript- und Proteinanalysen und belaufen sich auf weniger als 25% (Ausnahme YHUM1886 *FLO8-GFP*).

Dahingegen scheint *Whi3* die Proteinmengen der getesteten Kandidaten eher positiv zu regulieren, da sowohl die *Tpk1*-, *Yak1*- *Tec1*- als auch die *Mig2*-Proteinmenge in Abwesenheit von *WHI3* um mehr als 20% sanken. Diese Beobachtung lässt bereits auf eine posttranskriptionelle Regulation einiger Kandidatengene durch das RBP *Whi3* schließen. Um diesen posttranskriptionellen Einfluss weiterhin zu verdeutlichen, wurde das Verhältnis von Protein zu mRNA gebildet und in einem Graphen dargestellt (Abb. 21B). Die Deletion von *WHI3* führte zu einer zweifachen Abnahme des Protein/mRNA-Verhältnisses von *Tpk1*, *Yak1*

und Tec1. Diese Daten mit genomisch markiertem Yak1 bestätigen die zuvor gewonnenen, Plasmid-basierten Ergebnisse für GFP-Yak1/Yak1-3HA (siehe Abb. 14). Des Weiteren identifizierte diese Analyse Tpk1 und Tec1 als weitere Haupt-Effektoren von Whi3. Im Fall von *PHD1-GFP*, *MPT5-GFP* und *MIG2-GFP* konnte ein weniger signifikantes Absinken der Protein/mRNA-Werte um das 1,5-fache beobachtet werden. Folglich könnten Phd1, Mpt5 und Mig2 ebenfalls Effektoren von Whi3 darstellen. Im Gegensatz dazu unterlagen die anderen beiden Gene, *TPK2* und *FLO8*, keiner signifikanten Kontrolle durch Whi3 (< 1,5-fach).

Um zu bestimmen, ob die für die Whi3-abhängige Regulation verantwortlichen Sequenzen in der 5'-UTR oder dem ORF selbst liegen, wurden außerdem verkürzte GFP-Versionen der Kandidatengene hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die ersten 99 bp der jeweiligen ORFs, in denen sich häufig regulatorische Regionen zur Translationskontrolle befinden, im *WHI3*- und *whi3Δ*-Hintergrund mit *GFP* fusioniert, während der restliche ORF gleichzeitig deletiert wurde (*ORF¹⁻⁹⁹-GFP*). Diese Stämme wurden ebenfalls einem Adhäsionstest unterzogen, um die Auswirkungen der fast vollständigen Deletion der einzelnen ORFs auf die Adhäsionsfähigkeit zu überprüfen (Abb. 22).

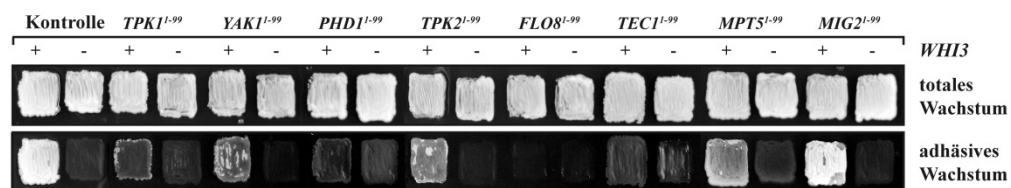


Abb. 22: Funktionalitätsanalyse der GFP-markierten Regulatoren der Zelldifferenzierung mit Hilfe eines Adhäsionstests.

Zur weiteren Funktionalitätsbestimmung der Kandidatengene *TPK1*, *YAK1*, *PHD1*, *TPK2*, *FLO8*, *TEC1*, *MPT5* und *MIG2* wurden die Hefestämme mit den verkürzten GFP-Fusionen YHUM2047 (*TPK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM2048 (*TPK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1760 (*YAK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1762 (*YAK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM2043 (*PHD1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM2044 (*PHD1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1938 (*TPK2¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1940 (*TPK2¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1934 (*FLO8¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1936 (*FLO8¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1747 (*TEC1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1748 (*TEC1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1931 (*MPT5¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1933 (*MPT5¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1928 (*MIG2¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*) und YHUM1930 (*MIG2¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*) ebenfalls einem Adhäsionstest an YEPD-Agarplatten unterzogen. Nach fünftägigem Wachstum bei 30 °C wurden die Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert.

Der *WHI3*-Stamm mit *MIG2¹⁻⁹⁹-GFP* adhärierte ähnlich stark wie der *WHI3*-Ausgangsstamm (Kontrolle), während die fast vollständige Deletion von *YAK1*, *PHD1*, *TPK2*, *FLO8* bzw. *TEC1* im *WHI3*-Hintergrund erwartungsgemäß zu einer signifikanten Verschlechterung der Adhäsion an Agarplatten führte. Auch der *TPK1¹⁻⁹⁹-GFP*- und *MPT5¹⁻⁹⁹-GFP*-Stamm adhärierten etwas schlechter als der *WHI3*-Kontrollstamm. Frühere Studien konnten jedoch einen negativen Einfluss von Tpk1 auf die Adhäsion beobachten, während Mpt5 in

Abhängigkeit des verwendeten Stammhintergrunds sowohl als positiver als auch negativer Regulator von *FLO11* identifiziert werden konnte (Pan and Heitman, 2000; Prinz et al., 2007; Lo et al., 2012). Im *whi3Δ*-Hintergrund führten die Markierung mit *GFP* und die fast vollständige Deletion der entsprechenden ORFs zu keiner signifikanten Veränderung der Adhäsion. Anschließend wurden erneut quantitative Transkript- und Proteinanalysen der verkürzten Fusionsgene in An- und Abwesenheit von *WHI3* durchgeführt und der posttranskriptionelle Einfluss von *Whi3* als Protein/mRNA-Verhältnis dargestellt (Abb. 21 und 23).

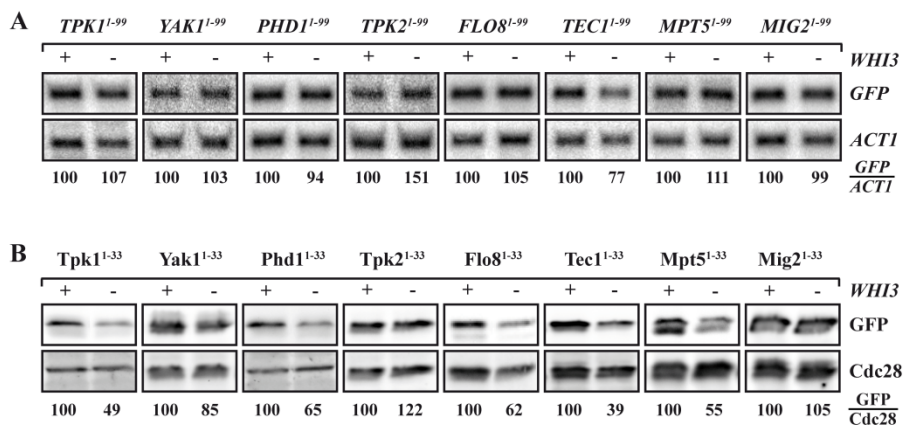


Abb. 23: Posttranskriptioneller Einfluss von *WHI3* auf verkürzte, GFP-markierte Versionen verschiedener Schlüsselregulatoren der Adhäsion und Zellentwicklung.

(A) Zur Untersuchung des posttranskriptionellen Einflusses von *WHI3* auf *P_{MIG2}-GFP* und die verkürzten *GFP*-Fusionen von *TPK1*, *YAK1*, *PHD1*, *TPK2*, *FLO8*, *TEC1*, *MPT5* und *MIG2* wurden die Hefestämme YHUM2221 (*P_{MIG2}-GFP*, *WHI3*), YHUM2222 (*P_{MIG2}-GFP*, *whi3Δ*), YHUM2047 (*TPK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM2048 (*TPK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1760 (*YAK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1762 (*YAK1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM2043 (*PHD1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM2044 (*PHD1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1938 (*TPK2¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1940 (*TPK2¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1934 (*FLO8¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1936 (*FLO8¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1747 (*TEC1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1748 (*TEC1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1931 (*MPT5¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1933 (*MPT5¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1928 (*MIG2¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*) und YHUM1930 (*MIG2¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*) nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium einer quantitativen Northern-Analyse mit radioaktiv markierten *GFP*- und *ACT1*-DNA-Sonden unterzogen. Die Zahlen geben relative Transkriptwerte der *GFP*-markierten Gene nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* an, wobei der Wert des jeweiligen *WHI3*-Stamms auf 100% festgelegt wurde. (B) Quantitative Western-Analyse der Stämme aus (A) mit den Primärantikörpern α -GFP und α -Cdc28. Die Zahlen geben relative Proteinwerte der *GFP*-markierten Gene nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle Cdc28 an, wobei der Wert des jeweiligen *WHI3*-Stamms erneut auf 100% festgelegt wurde.

Es zeigte sich, dass die fast vollständige Deletion des *TPK1*-, *PHD1*-, *TPK2*- bzw. *TEC1*-ORFS zu keiner signifikanten Veränderung des Protein/mRNA-Verhältnisses führte, was darauf schließen lässt, dass die *Whi3*-regulierten Sequenzen innerhalb der 5'-UTR der *TPK1*-, *PHD1*- und *TEC1*-mRNA liegen. Im Gegensatz dazu verloren die verkürzten Versionen von *YAK1* und *MIG2* ihre Abhängigkeit von *Whi3*. Folglich scheint *Whi3* beide Gene über ihren

jeweiligen ORF zu steuern. Eine interessante Ausnahme bildet *MPT5*, dessen Protein/mRNA-Verhältnis erst nach fast vollständiger Deletion des ORFs sank. Dies deutet darauf hin, dass *Whi3* *MPT5* ebenfalls auf posttranskriptioneller Basis über dessen 5'-UTR regulieren könnte, jedoch im Normalfall durch andere Mechanismen überdeckt sein könnte. Eventuell trägt *Whi3* nur unter bestimmten Bedingungen signifikant zur Produktion des nativen vollständigen Proteins bei.

2.1.9 Die Abwesenheit von *WHI3* verhindert die nukleäre Akkumulation der PKA-Untereinheit Tpk1

Viele der hier untersuchten Proteine unterliegen neben transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulationen außerdem einer räumlichen Kontrolle und sind in der Lage zwischen Kern und Cytoplasma zu translozieren. So müssen z. B. die Transkriptionsfaktoren Phd1, Flo8, Tec1 und Mig2 im Kern akkumulieren, um die Transkription ihrer Zielgene zu steuern, und auch die Proteinkinase Yak1 transloziert in den Kern, um Zielproteine zu phosphorylieren (Moriya and Shimizu-Yoshida, 2001). Aus diesem Grund sollte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden, ob *Whi3* in Analogie zu *Cln3* ebenfalls die zelluläre Lokalisation der GFP-markierten Fusionsproteine beeinflusst (Abb. 24). Im *WHI3*-Stamm akkumulierten sowohl Tpk1, Yak1, Tpk2, Flo8, Tec1 als auch Mig2 im Kern, während die anderen Fusionsproteine diffus in Cytoplasma und Kern verteilt waren. Die Deletion von *WHI3* führte zu keiner signifikanten Lokalisationsänderung der vollständigen oder verkürzten Fusionsproteine oder von GFP allein. Eine Ausnahme bildete Tpk1-GFP, dessen nukleäre Akkumulation im *whi3Δ*-Stamm verloren ging (Abb. 24C). Die Sequenzen zur räumlichen Kontrolle des vollständigen Tpk1-Fusionsproteins scheinen innerhalb des ORFs zu liegen, da das verkürzte Tpk1¹⁻³³-GFP-Konstrukt unabhängig von *WHI3* diffus im Cytoplasma verteilt vorlag. Diese Daten deuten darauf hin, dass *Whi3* in der Lage ist die Lokalisation des vollständigen Tpk1-Proteins zu beeinflussen. Auf welche Weise *Whi3* diese Funktion ausübt und welche biologische Relevanz dieser Mechanismus erfüllt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

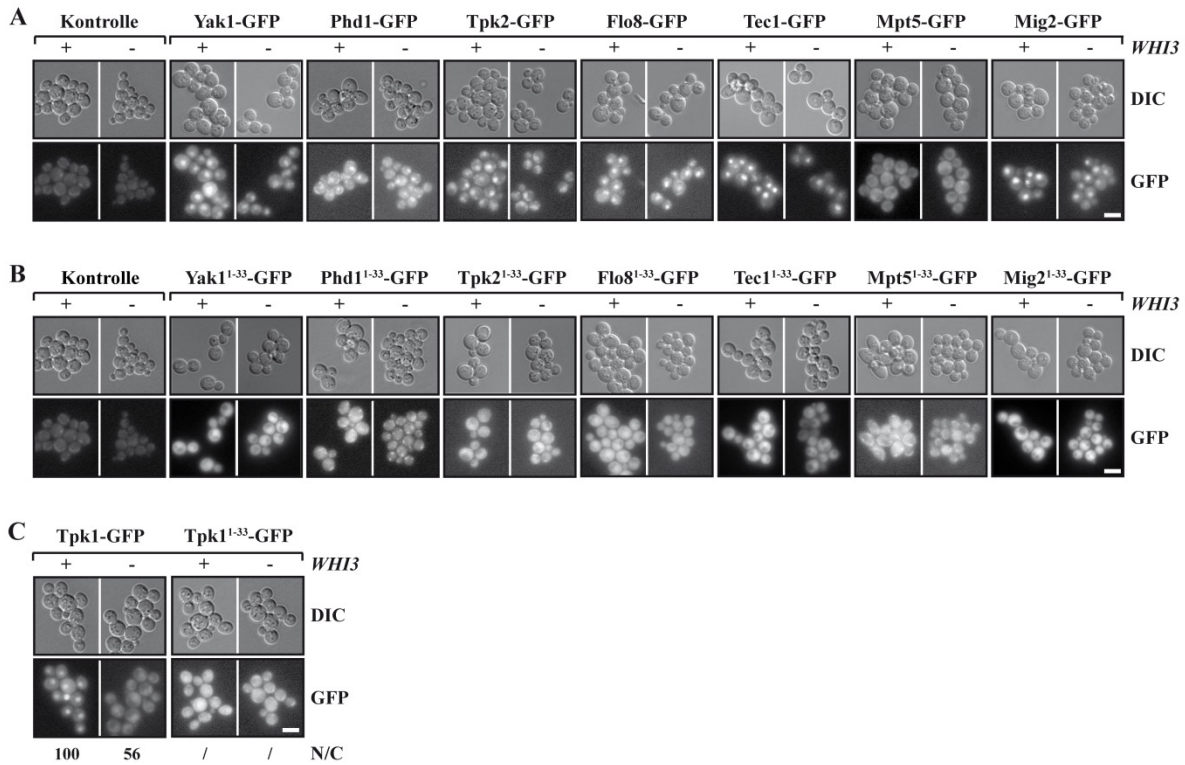


Abb. 24: Die Deletion von *WHI3* verhindert die Akkumulation von Tpk1 im Kern.

(A) Um die Auswirkung von *WHI3* auf die Lokalisation der GFP-markierten Fusionsproteine von Yak1, Phd1, Tpk2, Flo8, Tec1, Mpt5 und Mig2 zu untersuchen, wurden die Kontrollhefestämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1920 (*whi3Δ*) sowie die Hefestämme mit den vollständigen GFP-Fusionen YHUM1755 (*YAK1-GFP, WHI3*), YHUM1757 (*YAK1-GFP, whi3Δ*), YHUM2041 (*PHD1-GFP, WHI3*), YHUM2042 (*PHD1-GFP, whi3Δ*), YHUM1937 (*TPK2-GFP, WHI3*), YHUM1939 (*TPK2-GFP, whi3Δ*), YHUM1886 (*FLO8-GFP, WHI3*), YHUM1935 (*FLO8-GFP, whi3Δ*), YHUM1745 (*TEC1-GFP, WHI3*), YHUM1746 (*TEC1-GFP, whi3Δ*), YHUM1885 (*MPT5-GFP, WHI3*), YHUM1932 (*MPT5-GFP, whi3Δ*), YHUM1884 (*MIG2-GFP, WHI3*) und YHUM1929 (*MIG2-GFP, whi3Δ*) nach dem Wachstum in LFM+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregung von 395 nm (GFP) untersucht. Der Referenzbalken entspricht 5 μ m. (B) Analog zu (A) wurde ferner die Lokalisation der verkürzten Fusionskonstrukte im *WHI3*- und *whi3Δ*-Hintergrund in den Hefestämmen YHUM1760 (*YAK1¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*), YHUM1762 (*YAK1¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*), YHUM2043 (*PHD1¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*), YHUM2044 (*PHD1¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*), YHUM1938 (*TPK2¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*), YHUM1940 (*TPK2¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*), YHUM1934 (*FLO8¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*), YHUM1936 (*FLO8¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*), YHUM1747 (*TEC1¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*), YHUM1748 (*TEC1¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*), YHUM1931 (*MPT5¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*), YHUM1933 (*MPT5¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*), YHUM1928 (*MIG2¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*) und YHUM1930 (*MIG2¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*) bestimmt. (C) Analog zu (A) wurde die Lokalisation der vollständigen und verkürzten GFP-Versionen von *TPK1* in den Hefestämmen YHUM2045 (*TPK1-GFP, WHI3*), YHUM2046 (*TPK1-GFP, whi3Δ*), YHUM2047 (*TPK1¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*) und YHUM2048 (*TPK1¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*) untersucht.

Zusammenfassend scheint Whi3 in der Lage zu sein zahlreiche Regulatoren des adhäsiven Wachstums auf posttranskriptioneller Basis über die jeweiligen 5'-UTRs und ORF-Regionen der entsprechenden mRNAs positiv zu regulieren.

2.2 Regulation der Zellzyklusprogression durch Whi3

2.2.1 Whi3 reguliert mehrere G1-Cycline auf posttranskriptioneller Ebene

Frühere Daten zeigen, dass Whi3 neben der Adhäsion auch die Zellgröße positiv beeinflusst und zu diesem Zweck die Lokalisation des G1-Cyclins Cln3 kontrolliert (Garí et al., 2001). Whi3 bindet jedoch auch die *CLN1*- und *CLN2*-mRNA und könnte somit weitere G1-Cycline steuern (Garí et al., 2001; Colomina et al., 2008). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine solche Kontrolle vorliegt und ob diese ähnlich wie im Fall von Yak1, Tpk1 und Tec1 auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt. Zu diesem Zweck wurden *CLN1* und *CLN2* genomisch, C-terminal mit *GFP* im *WHI3*- und *whi3Δ*-Hintergrund markiert sowie verkürzte Versionen der beiden G1-Cycline hergestellt (*CLN1¹⁻⁹⁹-GFP* und *CLN2¹⁻⁹⁹-GFP*). Die Funktionalität von *CLN1-GFP* und *CLN2-GFP* wurde an Hand der Zellgröße mit Hilfe eines Coulter Partikelanalysators sowie mikroskopischer Aufnahmen überprüft (Abb. 25A). Beide Experimente zur Zellgrößenbestimmung bestätigten zuvor veröffentlichte Daten, dass die Deletion von *WHI3* zu einer Abnahme der Zellgröße von ca. 20% führt (Nash et al., 2001). Ferner wiesen die Stämme mit *CLN1-GFP* und *CLN2-GFP* eine ähnliche Zellgröße wie ihre jeweiligen *WHI3*- bzw. *whi3Δ*-Kontrollstämme auf, was darauf hindeutet, dass beide Gene trotz C-terminaler GFP-Fusion voll funktionsfähig sind. Anschließend wurden mittels quantitativer Northern- und Western-Analysen die Transkript- und Proteinmengen der Cln1- und Cln2-Fusionskonstrukte in Abhängigkeit von *WHI3* untersucht (Abb. 25B). Um den tatsächlichen posttranskriptionellen Einfluss von *WHI3* auf *CLN1-GFP*, *CLN1¹⁻⁹⁹-GFP*, *CLN2-GFP* und *CLN2¹⁻⁹⁹-GFP* zu bestimmen, wurde außerdem das Verhältnis von Protein/mRNA gebildet (Abb. 25C). Im *whi3Δ*-Hintergrund sank das Protein/mRNA-Verhältnis von beiden *CLN1*-Konstrukten signifikant auf ca. 40%, was darauf hindeutet, dass Whi3 das G1-Cyclin Cln1 über dessen 5'-UTR reguliert. Das Protein/mRNA-Verhältnis von *CLN2-GFP* hingegen blieb unverändert im *whi3Δ*-Hintergrund und erst die fast vollständige Deletion des *CLN2*-ORFs im Fall des verkürzten Konstruktes führte zu einer sichtbaren Reduktion des Protein/mRNA-Wertes auf ca. 65%. Folglich scheint Cln2 nur geringfügig durch Whi3 reguliert zu werden und weiteren Regulationen durch andere Faktoren zu unterliegen, die den Einfluss von Whi3 unter den getesteten Bedingungen überdecken.

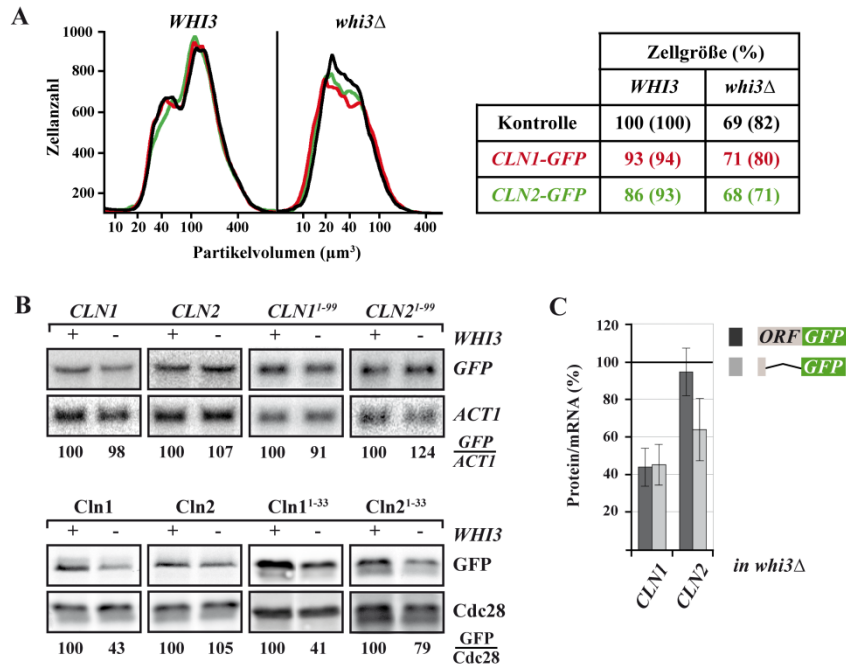


Abb. 25: Whi3 kontrolliert die G1-Cycline Cln1 und Cln2 auf posttranskriptioneller Basis.

(A) Um zu überprüfen, ob die GFP-Markierungen von *CLN1* und *CLN2* einen Einfluss auf die Zellgröße haben, wurde das Zellvolumen der *WHI3*-Hefestämme YHUM468 (Kontrolle), YHUM1888 (*CLN1-GFP*) und YHUM1926 (*CLN2-GFP*) sowie der *whi3Δ*-Hefestämme YHUM1920 (Kontrolle), YHUM1921 (*CLN1-GFP*) und YHUM1923 (*CLN2-GFP*) nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase mit Hilfe des Coulter Partikelanalysators sowie mikroskopischer Aufnahmen ermittelt. Der Graph zeigt die absoluten Partikelvolumen der Coulter Analyse (je 20.000 Ereignisse) und die Tabelle die relative Zellgröße aus den Coulter (ohne Klammern) bzw. mikroskopischen (in Klammern) Untersuchungen. Dabei wurde der Wert des *WHI3*-Kontrollstamms jeweils auf 100% festgelegt. (B) Zur Bestimmung des posttranskriptionellen Einflusses von *WHI3* auf die G1-Cycline Cln1 und Cln2 wurden die Hefestämme aus (A) sowie die Stämme mit den verkürzten GFP-Versionen YHUM1925 (*CLN1¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*), YHUM1927 (*CLN1¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*), YHUM1922 (*CLN2¹⁻⁹⁹-GFP*, *WHI3*) und YHUM1924 (*CLN2¹⁻⁹⁹-GFP*, *whi3Δ*) quantitativen Northern- (oben) und Western-Analysen (unten) mit radioaktiv markierten *GFP*- und *ACT1*-DNA-Sonden bzw. den Primärantikörpern anti-GFP und anti-Cdc28 unterzogen. Die Zahlen geben die relativen Transkript- bzw. Proteinmengen der GFP-Fusionskonstrukte nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle *ACT1* bzw. Cdc28 an, wobei der Wert des jeweiligen *WHI3*-Stamms auf 100% festgesetzt wurde. (C) Zur besseren Übersicht über die posttranskriptionelle Regulation durch *WHI3* wurden die relativen mRNA- und Proteinwerte der *whi3Δ*-Stämme aus (B) nach der Normalisierung mit den jeweiligen *WHI3*-Stämmen zu einem Quotienten zusammengefasst (Protein/mRNA). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten an und betragen weniger als 25%.

Die Lokalisation der beiden G1-Cycline scheint durch die Abwesenheit von *WHI3* nicht beeinflusst zu werden (Abb. 26). Sowohl die vollständigen GFP-Fusionsproteine als auch die verkürzten Konstrukte sind in beiden Stammhintergründen diffus im Cytoplasma und Kern verteilt.

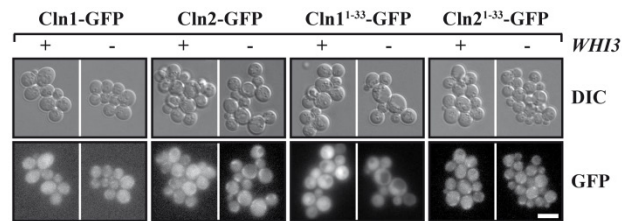


Abb. 26: *WHI3* übt keinen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der GFP-markierten G1-Cycline Cln1 und Cln2 aus.

Um die Abhängigkeit der Lokalisation der G1-Cycline Cln1 und Cln2 von *WHI3* zu bestimmen, wurden die Hefestämme YHUM1888 (*CLN1-GFP, WHI3*), YHUM1921 (*CLN1-GFP, whi3Δ*), YHUM1926 (*CLN2-GFP, WHI3*), YHUM1923 (*CLN2-GFP, whi3Δ*), YHUM1925 (*CLN1¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*), YHUM1927 (*CLN1¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*), YHUM1922 (*CLN2¹⁻⁹⁹-GFP, WHI3*) und YHUM1924 (*CLN2¹⁻⁹⁹-GFP, whi3Δ*) nach dem Wachstum in LFM+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) und fluoreszenzmikroskopisch bei einer Anregung von 395 nm (GFP) untersucht. Der Referenzbalken entspricht 5 μ m.

Zusammenfassend deuten die hier gewonnen Ergebnisse darauf hin, dass Whi3 die Zellgröße neben Cln3 auch über weitere G1-Cycline steuern könnte.

2.3 Potentielle Mechanismen der Whi3-vermittelten posttranskriptionellen Kontrolle

2.3.1 Analyse der Whi3-abhängigen, regulatorischen Sequenzen

RBP's binden häufig bestimmte Sequenzen oder strukturelle Elemente innerhalb ihrer Zieltranskripte. Für das RRM-Domänen Protein Whi3 konnte bisher die Konsensussequenz GCAU beschrieben werden, die zumindest für die Lokalisationskontrolle der *CLN3*-mRNA wichtig zu sein scheint (Colomina et al., 2008). Es stellt sich jedoch die Frage, ob diese Sequenz auch für die hier beobachtete Regulation der Protein/mRNA-Verhältnisse hinreichend ist. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Whi3-abhängigen Bereiche grob an Hand der oben durchgeführten Experimente mit den verkürzten und vollständigen Kandidatengenomen bestimmt. Diese Analyse zeigte, dass sowohl Sequenzen innerhalb der 5'-UTR als auch in der jeweiligen ORF-Region der Transkripte die Whi3-Kontrolle vermitteln können (Tab. 1). Eine mögliche Regulation über die 3'-UTR wurde hier nicht untersucht, da der natürliche Terminator aufgrund der genomischen, C-terminalen Markierung durch den *ADHI*-Terminator ersetzt wurde. Um ferner das Vorkommen von GCAU-Tetranukleotiden innerhalb der Whi3-kontrollierten Transkripte zu ermitteln, wurden zunächst die vorhergesagten UTR-Regionen mit Hilfe von Literaturdaten genomweiter Analysen bestimmt (Miura et al., 2006; Nagalakshmi et al., 2008). Anschließend wurden sowohl die jeweiligen

5'-UTRs und ORF-Regionen als auch die 3'-UTRs mit Hilfe der Hefedatenbank SGD (www.yeastgenome.org) hinsichtlich des Vorkommen von GCAU-Sequenzen untersucht.

Tab. 1: Übersicht über die Whi3-vermittelte Kontrolle der in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene und *CLN3*.

Korrelation zwischen der Anzahl der putativen Whi3-Konsensussequenz GCAU innerhalb der 5'-UTR, ORF-Region bzw. 3'-UTR der hier getesteten Kandidatengene (Miura et al., 2006; Nagalakshmi et al., 2008) und der Whi3-vermittelten direkten Bindung der jeweiligen mRNA (Garí et al., 2001; Colomina et al., 2008), posttranskriptionellen Kontrolle oder Kontrolle der Lokalisation (diese Arbeit).

Gen	Länge 5'-UTR (bp)	Anzahl GCAUs			Whi3- regulierte Region	mRNA durch Whi3 gebunden	Lokalisation abhängig von Whi3
		5'-UTR	ORF	3'-UTR			
<i>TPK1</i>	220	3	2	3	5'-UTR	-	+
<i>YAK1</i>	89-111	/	4	/	ORF	-	-
<i>PHD1</i>	271	2	4	1	5'-UTR	-	-
<i>TPK2</i>	162-177	2	6	/	/	-	-
<i>FLO8</i>	171	2	3	1	5'-UTR	-	-
<i>TEC1</i>	155	1	5	1	5'-UTR	+	-
<i>MPT5</i>	112	/	8	4	5'-UTR	+	-
<i>MIG2</i>	41-117	1	5	1	ORF	+	-
<i>CLN1</i>	378-631	2	2	/	5'-UTR	+	-
<i>CLN2</i>	183	2	4	/	5'-UTR	+	-
<i>CLN3</i>	319	6	6	2	5'-UTR & ORF	+	+

Während die *CLN3*-mRNA über insgesamt 12 GCAU-Tetranukleotide verfügt, enthalten die mindestens zweifach regulierten Kandidatengene drei (*TPK1*), vier (*YAK1*), eins (*TEC1*) bzw. zwei (*CLN1*) dieser Motive in den Whi3-kontrollierten Regionen. Des Weiteren befinden sich zusätzliche GCAU-Sequenzen in den nicht regulierten Bereichen. Doch auch die Gene, die nicht signifikant ($< 1,5$ -fach) durch Whi3 reguliert werden, weisen insgesamt sechs (*TPK2*) bzw. acht (*FLO8*) GCAU-Tetranukleotide innerhalb der 5'-UTR und ORF-Region auf. Es ist demnach fraglich, ob Whi3 die Proteinmengen der jeweiligen Gene ebenfalls über GCAU-Motive reguliert oder ob andere distinkte Elemente für diese Kontrolle verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurde in den jeweiligen Whi3-abhängigen Bereichen bioinformatisch nach weiteren Konsensussequenzen gesucht. Allerdings blieb diese Analyse u. a. aufgrund der geringen statistischen Signifikanz der Probengröße erfolglos. Es ist außerdem unklar, ob Whi3 die posttranskriptionelle Kontrolle der Zielgene direkt oder indirekt über andere Faktoren ausübt, da Whi3 zwar die *TEC1*- und *CLN1*-mRNA in einer Immunopräzipitationsanalyse bindet, nicht jedoch die *TPK1*- oder *YAK1*-mRNA (Garí et al., 2001; Colomina et al., 2008).

2.3.2 CLIP-Analyse zur Isolation *Whi3*-abhängiger regulatorischer Sequenzen

Da in der bioinformatischen Analyse der *Whi3*-regulierten Gene keine Konsensussequenz ermittelt werden konnte, sollten die *Whi3*-gebundenen regulatorischen Sequenzen in einem globaleren Ansatz mit Hilfe der „Crosslinking-Immunoprecipitations-Analyse“ (CLIP) identifiziert werden (Abb. 27A). Diese Methode ermöglicht es die *in vivo* gebundenen mRNA-Sequenzen auf 50 bis 70 bp einzugrenzen und somit effizienter nach Konsensussequenzen zu suchen. Zu diesem Zweck wird zunächst das TAP-markierte *Whi3* *in vivo* durch UV-Strahlen mit seinen gebundenen mRNAs kovalent verknüpft. Nach erfolgreichem Zellaufschluss werden die *Whi3*-mRNA-Komplexe zweifach mit Hilfe der TAP-Markierung über eine IgG- bzw. Calmodulin-haltige Sepharosematrix aufgereinigt (Abb. 27B). Es folgt eine Behandlung der Proben mit RNase A, wobei die *Whi3*-gebundenen Sequenzen (ca. 50 bis 70 bp) vor diesem Abbau geschützt sind, und anschließend der Verdau von *Whi3* mit Proteinase K. Mit Hilfe von RNA-Adaptoren, die an die 5'- und 3'-Enden der 50 bis 70 bp langen mRNA-Fragmente ligiert werden, können die *Whi3*-abhängigen Regionen schließlich amplifiziert und sequenziert werden.

In Vorversuchen sollte zunächst die Effizienz der *Whi3*-TAP-Aufreinigung ohne UV-Bestrahlung getestet werden. Zu diesem Zweck wurde *WHI3* genomisch, C-terminal mit TAP markiert, welches aus einem ProteinA- und einem Calmodulin-bindenden Protein (CBP) besteht. Nach der Kultivierung der Proben in flüssigem Voll- (YEPD) oder Minimalmedium (YNB+Trp+Ura) wurden die Zellen mit der French Press aufgeschlossen. Die *WHI3*-TAP-Expression vom nativen *WHI3*-Promotor resultierte in moderaten Mengen des Fusionsproteins mit einer Größe von ca. 100 kDa (Abb. 27C), wobei der alternative Aufschluss mit der Kugelmühle bei 4 °C keine Verbesserung zeigte. Nach der ersten Aufreinigung über eine IgG-Sepharosematrix wurde die TAP-Markierung mit Hilfe der TEV-Protease zwischen ProteinA und CBP geschnitten, um *Whi3*-CBP (ca. 75 kDa) zu eluieren. Dieser Verdau musste entgegen den Herstellerangaben auf maximal 3 h verkürzt werden, da das Fusionsprotein beim Verdau über Nacht trotz Inkubation bei 4 °C vollständig degradierte. Daraufhin wurde das Eluat über eine Calmodulin-haltige Sepharosematrix nochmals aufgereinigt und *Whi3*-CBP schließlich durch Inkubation für 5 min bei 95 °C eluiert.

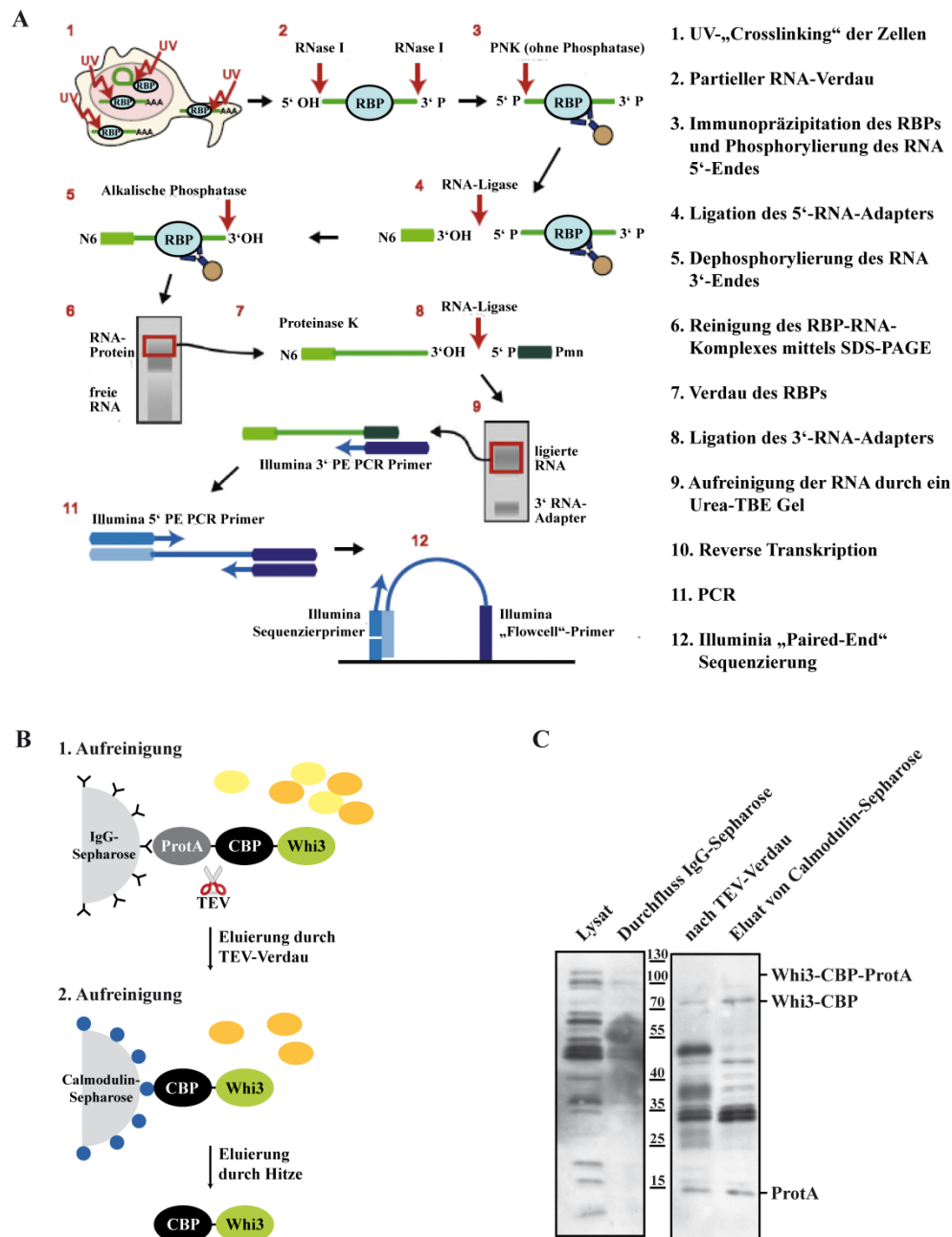


Abb. 27: „Crosslinking Immunopräzipitations-Analyse“ (CLIP) zur Identifikation von Whi3-gebundenen mRNAs und Zielsequenzen *in vivo*.

(A) Schematische Übersicht über den experimentellen Ablauf des CLIP-Experiments nach Wang (2009). Nähere Informationen siehe Material- und Methodenteil. (B) Detailliertes Schema des ersten Aufreinigungsschrittes des RBPs [Schritt 3 aus (A)] über IgG- und Calmodulin-Sepharose. Zur Optimierung dieser beiden Präzipitationen sollte der Hefestamm YHUM1628 (*WHI3-TAP*) nach der Kultivierung in YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase zunächst ohne UV-Bestrahlung aufgereinigt werden. Dabei erfolgt die erste Eluierung von der IgG-Sepharose durch Zugabe der TEV-Protease, welche zwischen dem ProteinA (ProtA) und dem Calmodulin-bindenden Protein (CBP) innerhalb der TAP-Markierung schneidet und somit zur Freilassung von Whi3-CBP führt. Whi3-CBP wird von der Calmodulin-Sepharose in der zweiten Elution durch Erhitzen für 5 min auf 95 °C gelöst. (C) Western-Analyse ausgewählter Fraktionen der Test-Immunopräzipitation von Whi3-TAP aus (B). Es wurden Proben des Gesamtzellextraktes (Lysat), des Durchflusses von der IgG-Sepharose, sowie Proben nach dem TEV-Verdau und von der Hitzeelution aufgetragen. Die Whi3-Fusionen wurden mit Hilfe des Primärantikörpers anti-Calmodulin detektiert.

Allerdings war die aufgereinigte Whi3-Proteinmenge sowohl nach der ersten als auch der zweiten Elution sehr gering und keinesfalls ausreichend für die nachfolgenden Schritte des CLIP-Experimentes. Des Weiteren befand sich eine ca. 35 kDa große Bande unbekannten Ursprungs im Endeluat. Um die Aufreinigung weiterhin zu verbessern, wurden unterschiedliche Ansätze getestet. Zum einen wurde den Proben nach dem Zellaufschluss verschiedene Proteaseinhibitoren zugesetzt, um den Abbau von Whi3-CBP während des TEV-Verdaus zu verhindern: (i) „Complete Protease Inhibitor Mix ohne EDTA“, (ii) Protease Mix I (500 μ M DTT, 500 μ M PMSF, 1 μ M Leupeptin, 2 μ M Pepstatin, 4 μ M Chymostatin, 1 mM TLCK, 142 μ M TPCK). Des Weiteren wurde die Probenmenge auf 3 l erhöht und durch eine 1%ige TritonX-Behandlung versucht den Zellaufschluss zu optimieren. Allerdings führte keine dieser Maßnahmen zur Verbesserung der Aufreinigung. Die Überexpression des RBPs war ebenfalls ausgeschlossen, da dies in einem G1-Arrest resultieren würde. Aufgrund der geringen Mengen aufgereinigten Whi3-CBPs wurde das CLIP-Experiment schließlich nicht weiter verfolgt. Alternativ könnten mit Hilfe von globalen Transkript- und Proteomanalysen eines *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamms diejenigen Gene identifiziert werden, die posttranskriptionell durch Whi3 reguliert werden. Da die hier gewonnenen Daten darauf schließen lassen, dass Whi3 relativ viele Gene auf posttranskriptionelle Basis reguliert, sollte eine ausreichende Anzahl Whi3-abhängiger Gene identifiziert werden, um bioinformatische Analysen zur Ermittlung von Whi3-Konsensussequenzen zu ermöglichen.

2.3.3 *WHI3*-defiziente Stämme weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber translationellen Inhibitoren auf.

Da Whi3 diverse Gene auf posttranskriptioneller Ebene reguliert, sollte eine mögliche Involvierung des RBPs in die Translationskontrolle bzw. Regulation der Proteinstabilität untersucht werden. Zunächst wurde der Einfluss von *WHI3* auf die Halbwertszeit von Yak1 untersucht (Abb. 28A). Zu diesem Zweck wurden ein *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamm, die GFP-Yak1 exprimieren, mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt, um die Proteinneusynthese zu verhindern und den Abbau von GFP-Yak1 zeitlich verfolgen zu können. Dabei wiesen der *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamm mit 52 bzw. 47 min ähnliche Halbwertszeiten auf, was darauf hindeutet, dass Whi3 nicht an der Proteinstabilität bzw. Degradation von Yak1 beteiligt ist.

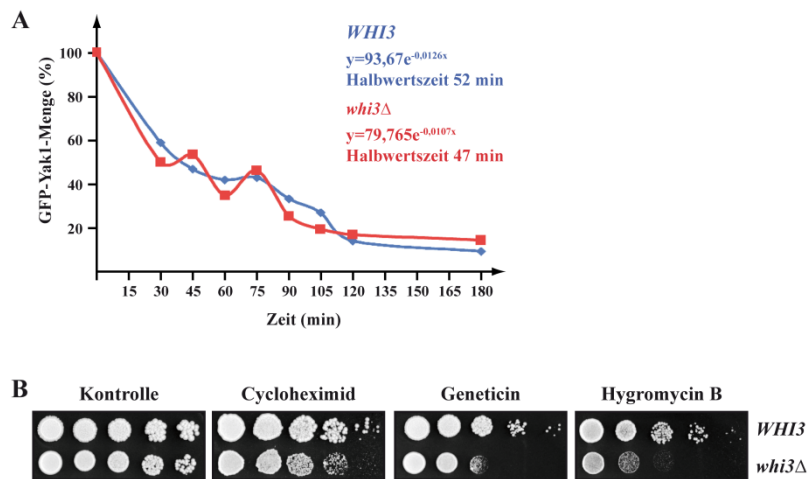


Abb. 28: Whi3 wird für die Resistenz gegenüber translationellen Inhibitoren, nicht jedoch für die Proteininstabilität von Yak1 benötigt.

(A) Um den Einfluss von *WHI3* auf die Halbwertszeit bzw. Proteininstabilität von GFP-Yak1 zu ermitteln, wurde den Hefestämmen YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1105 (*whi3Δ*) mit BHUM1119 (P_{YAK1} -GFP-YAK1) nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase 200 µg/ml des Translationsinhibitors Cycloheximid zugesetzt. Zu angegebenen Zeitpunkten nach der Cycloheximidgabe wurden Proben für eine quantitative Western-Analyse mit den Primärantikörpern anti-GFP und anti-Cdc28 entnommen. Die relativen GFP-Yak1-Mengen wurden nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle Cdc28 in Abhängigkeit von der Zeit in einem Graphen dargestellt. Die Halbwertszeiten von GFP-Yak1 im *WHI3*- und *whi3Δ*-Hintergrund wurden durch die Erstellung von logarithmischen Ausgleichskurven für beide Stämme ermittelt (Funktion siehe Graph).

(B) Zur Bestimmung der Sensitivität von *S. cerevisiae* gegenüber Inhibitoren der translationellen Elongation in Abhängigkeit von *WHI3* wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1920 (*whi3Δ*) nach dem Wachstum in flüssigem YEPD-Medium bis zur logarithmischen Phase auf festem YEPD-Medium (Kontrolle) oder auf YEPD-Platten mit verschiedenen Translationsinhibitoren aufgetropft (3 µg/ml Cycloheximid, 20 µg/ml Geneticin oder 65 µg/ml Hygromycin B). Nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C wurden die Platten fotografiert. Die Tropfen entsprechen seriellen Verdünnungen (von links nach rechts: unverdünnt, 5×, 25×, 125×, 625×).

Zur Untersuchung einer möglichen Involvierung von Whi3 in die Translationskontrolle wurde die Sensitivität des *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamms gegenüber geringen Dosen verschiedener Translationsinhibitoren mit Hilfe eines Tropftests überprüft (Abb. 28B). Dabei wurden aus Mangel an wirksamen *in vivo* Inhibitoren der Translationsinitiation ausschließlich Hemmstoffe der Elongation verwendet. Interessanter Weise zeigte der *whi3Δ*-Stamm eine eindeutig erhöhte Sensitivität gegenüber Geneticin und Hygromycin B im Vergleich zum *WHI3*-Stamm. In Übereinstimmung mit früheren Daten stieg die Sensitivität des *WHI3*-defizienten Stamms gegenüber Cycloheximid ebenfalls geringfügig (Nash et al., 2001). Zusammenfassend scheint die Anwesenheit von *WHI3* der Zelle eine höhere Resistenz gegenüber translationellen Inhibitoren zu verleihen und das RBP könnte folglich in die Kontrolle der Translation involviert sein. Dies würde die hier beobachteten verminderten Protein/mRNA Verhältnisse der Adhäsionsregulatoren und G1-Cycline im *whi3Δ*-Hintergrund erklären (siehe Abb. 21 und 25).

2.4 Regulation der Ploidiestabilität durch Whi3

2.4.1 Whi3 wird für die Ploidiestabilität benötigt.

Im Rahmen der genomischen GFP-Markierungen des *whi3* Δ -Stamms (*MATa*) wurde festgestellt, dass eine signifikante Anzahl der erhaltenen Klone sowohl markierte als auch unmarkierte Genversionen enthielten. Dies wurde zunächst in der Kontroll-PCR beobachtet, mit der die korrekte Markierung der einzelnen Gene überprüft werden sollte (Abb. 29A).

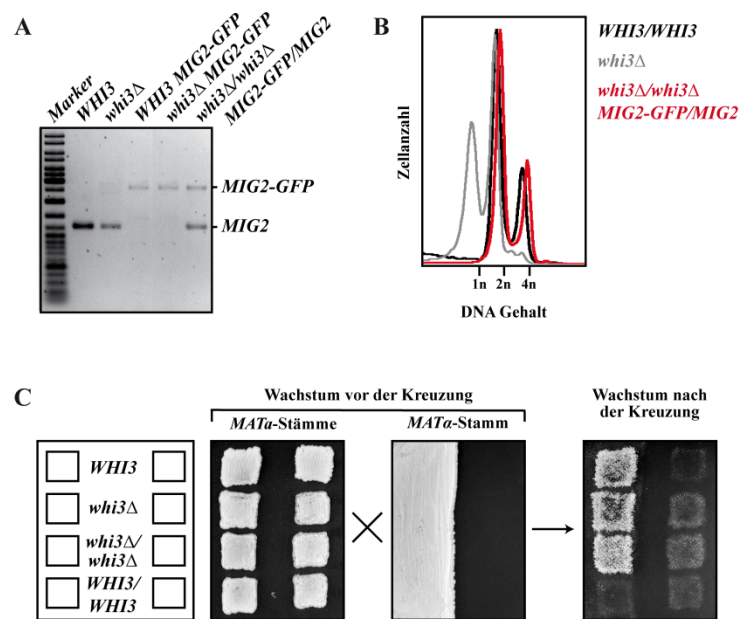


Abb. 29: Ploidieanalyse von *WHI3*- und *whi3* Δ -Stämmen mit *MIG2-GFP*.

(A) Detektion von *MIG2* und *MIG2-GFP*-Allelen mittels PCR. *MIG2* wurde in den haploiden Hefestämmen YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1920 (*whi3* Δ) genomisch mit *GFP* markiert und währenddessen für ca. 25 Generationen auf festem SC-Medium kultiviert. Es wurden mindestens 10 Klone und die Ausgangsstämme auf die Anwesenheit von *MIG2* bzw. *MIG2-GFP* mittels PCR untersucht. Alle Klone im *WHI3*-Hintergrund wiesen das gleiche Bandenmuster auf wie der Hefestamm YHUM1884 (*MIG2-GFP*, *WHI3*), während die Klone im *whi3* Δ -Hintergrund zwei distinkte Bandenmuster zeigten und von den Hefestämmen YHUM1929 (*MIG2-GFP*, *whi3* Δ) und YHUM2151 (*MIG2-GFP/MIG2*, *whi3* $\Delta/whi3$ Δ) repräsentiert werden. (B) Die Ploidie der Hefestämme YHUM492 (*WHI3/WHI3*), YHUM1920 (*whi3* Δ) und YHUM2151 (*MIG2-GFP/MIG2*, *whi3* $\Delta/whi3$ Δ) wurde in einer FACS-Analyse bestimmt. Nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase wurden die Stämme fixiert, mit RNase A und Proteinase K verdaut und schließlich die DNA mit Propidiumiodid gefärbt. Die x-Achse gibt den DNA-Gehalt der Zellen an mit 1n und 2n für Haploide bzw. 2n und 4n für Diploide. (C) Zur Bestimmung des Kreuzungstyps (*MAT*-Lokus) wurden die Uracil- und Tryptophan-defizienten *MATa* Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1920 (*whi3* Δ), YHUM2152 (*whi3* $\Delta/whi3$ Δ) und YHUM492 (*WHI3/WHI3*) sowie der *MATa*-Teststamm YHUM266 (*leu2* Δ *his3* Δ , *WHI3*) für zwei Tage auf festem YEPD-Medium kultiviert (Wachstum vor Kreuzung). Zum einen wurde der *MATa*-Stamm mit den anderen Stämmen auf eine frische YEPD-Platte kreuzplattiert und zum anderen alle Stämme einzeln auf frisches, festes YEPD-Medium überimpft. Nach fünfstündiger Erholungsphase zur Zygotenbildung wurden alle Stämme und Kreuzungen auf festes SC-Trp-Ura-Leu-His-Medium überführt, um kreuzungsfähige Zellen zu selektionieren (Wachstum nach der Kreuzung).

Während in der PCR der *WHI3*-haltigen Stämme entweder Banden für unmarkierte oder markierte Gene amplifiziert wurden, zeigten durchschnittlich zwei von 10 untersuchten *whi3Δ*-Klonen beide Bandentypen. Diese Klone verfügten außerdem FACS-Analysen zufolge über einen diploiden DNA-Gehalt, konnten jedoch weiterhin mit einem *MATα*-Stamm gekreuzt werden (Abb. 29B und C). Dies deutet darauf hin, dass die GFP-Markierung in diploiden *MATα/MATa whi3Δ/whi3Δ*-Stämmen erfolgt sein muss und dass der Verlust von *WHI3* zu einer erhöhten Genomduplikationsrate führen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte eine mögliche Ploidiezunahme des haploiden *MATa whi3Δ*-Stamms systematisch unter verschiedenen Bedingungen verfolgt werden (Abb. 30A). Zu diesem Zweck wurde der haploide *WHI3*- und der frisch generierte *whi3Δ*-Stamm für 72 Tage in flüssigem YNB- (Minimal-) oder YEPD- (Voll-) Medium bzw. auf YNB- oder YEPD-Agar kultiviert. Alle zwei Tage wurden Aliquots in bzw. auf frisches Medium überführt und der DNA-Gehalt der Zellen zu ausgesuchten Zeitpunkten mittels FACS-Analyse bestimmt. Den Erwartungen entsprechend konnte für den *WHI3*-Kontrollstamm unter keiner der getesteten Bedingungen eine signifikante Akkumulation von 4n-haltigen Zellen beobachtet werden, so dass der Ploidiegehalt in Anwesenheit von *WHI3* sehr stabil zu sein scheint (Abb. 30B). Im Gegensatz dazu wies der *whi3Δ*-Stamm je nach Kultivierungsbedingung unterschiedlich hohe Genomduplikationsraten auf. So führte das Wachstum in flüssigem Minimalmedium für 72 Tage und ca. 250 Generationen lediglich zu einer sehr geringen Anzahl 4n-haltiger Zellen. Dahingegen wiesen die *whi3Δ*-Kulturen auf festem Minimalmedium wie auch in flüssigem Vollmedium ausschließlich diploide Zellen nach ebenfalls 72 Tagen auf. Die optimalste der hier getesteten Bedingungen für eine Ploidiezunahme des haploiden *whi3Δ*-Stamms scheint jedoch die Kultivierung auf festem Vollmedium zu sein, da hier bereits nach 14 Tagen und ca. 50 Generationen eine komplette Konversion der Kultur von haploiden zu diploiden Zellen erfolgte.

Die hohe Genomduplikationsrate des haploiden *whi3Δ*-Stamms gegenüber dem *WHI3*-Kontrollstamm könnte in einem signifikanten Wachstumsvorteil der diploiden Zellen gegenüber den haploiden Zellen begründet liegen, der sich jedoch nur in Abwesenheit von *WHI3* ausprägt. Somit würden sich diploide Zellen mit gleicher Wahrscheinlichkeit in der *WHI3*- und der *whi3Δ*-Kultur ausbilden, doch diese würden lediglich im Fall des *whi3Δ/whi3Δ*-Stamms zu einem Überwachsen der haploiden Zellen führen.

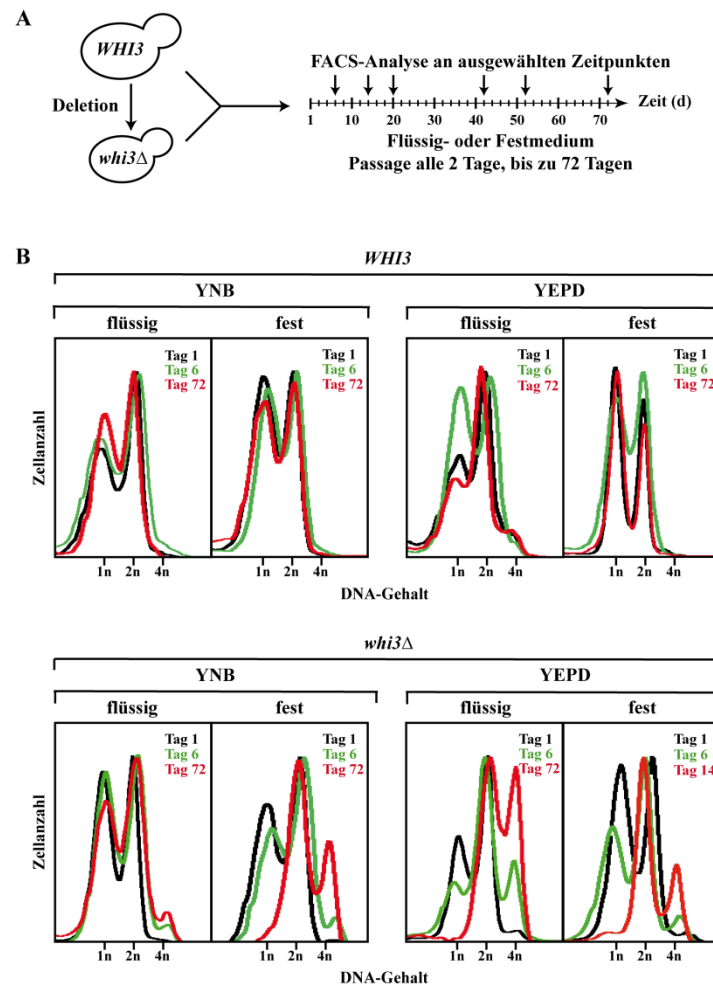


Abb. 30: Whi3 wird für die Ploidiestabilität unter verschiedenen Wachstumsbedingungen benötigt.

(A) Schema des experimentellen Aufbaus. Zur Bestimmung der Ploidiestabilität in Abhängigkeit von *WHI3* wurden der Hefestamm YHUM468 (*WHI3*) und der frisch generierte YHUM1920 (*whi3Δ*) für 72 Tage in flüssigem oder auf festem Medium kultiviert. Alle zwei Tage wurden Aliquots in bzw. auf frisches Medium überführt und zu angegebenen Zeitpunkten Proben für die Analyse des DNA-Gehalt mittels FACS entnommen. Die Durchführung und Auswertung der FACS-Daten erfolgte analog zu Abb. 29B. (B) DNA-Gehalt der *WHI3*- und *whi3Δ*-Stämme aus (A) nach Wachstum in flüssigem oder auf festem Medium (YNB+Trp+Ura oder YEPD). Pro Stamm und Bedingung sind der DNA-Gehalt nach Kultivierung für einen Tag (schwarz), sechs Tage (grün) und 72 Tage (rot) dargestellt. Für die *whi3Δ*-Kultur auf festem YEPD-Medium wurde der Chromosomengehalt nach 14 statt 72 Tagen gezeigt, da die Kultur bereits nach dieser Dauer hauptsächlich aus diploiden Zellen bestand und sich nicht mehr veränderte. Die x-Achse gibt den DNA-Gehalt der Zellen an mit 1n und 2n für haploide Zellen bzw. 2n und 4n für Diploide.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die Wachstumsgeschwindigkeiten des *WHI3*-, *whi3Δ*-, *whi3Δ/whi3Δ*- und *WHI3/WHI3*-Stamms in flüssigem bzw. auf festem YNB- und YEPD-Medium miteinander verglichen (Abb. 31). In flüssigem YNB-Medium wiesen der *WHI3*- und *WHI3/WHI3*-Stamm bzw. der *whi3Δ*- und *whi3Δ/whi3Δ* eine ähnliche Verdopplungszeit von 2,1 und 2 h bzw. 2,6 und 2,5 h auf und unterscheiden sich folglich nicht signifikant voneinander.

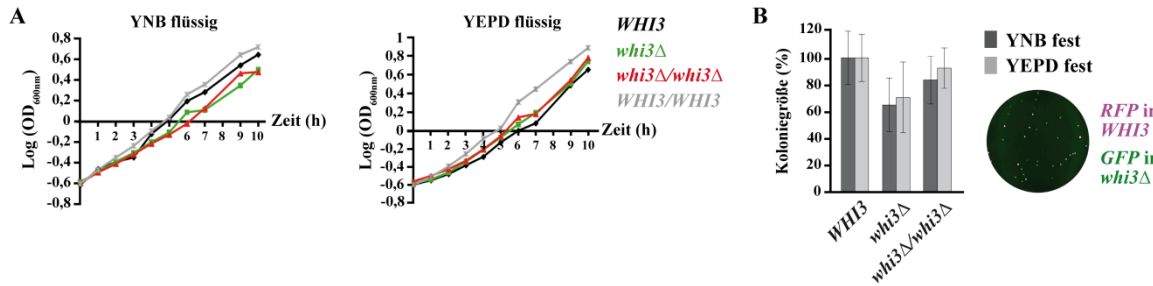


Abb. 31: Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von *WHI3*, der Ploidie und den Wachstumsbedingungen.

(A) Um den Einfluss der Ploidie auf die Wachstumsgeschwindigkeit der *WHI3*-defizienten Stämme in flüssigem Medium zu bestimmen, wurde eine Wachstumskurve der Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1920 (*whi3Δ*), YHUM2152 (*whi3Δ/whi3Δ*) und YHUM492 (*WHI3/WHI3*) in flüssigem YNB+Trp+Ura- (Minimal-) bzw. YEPD- (Voll-) Medium für einen Zeitraum von 10 h erstellt. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀) entnommen und diese in logarithmischer Form in Abhängigkeit von der Zeit in einen Graphen aufgetragen. (B) Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit der Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1920 (*whi3Δ*) und YHUM2152 (*whi3Δ/whi3Δ*) mit BHUM2027 (*P_{TDH3}-RFP*) oder BHUM2028 (*P_{TDH3}-GFP*) während des Wachstums auf festem YNB+Trp+Ura- bzw. YEPD-Medium. Je ein RFP- und GFP-exprimierender Stamm wurden zunächst separat bis zur logarithmischen Phase in YNB+Trp+Ura- bzw. YEPD-Medium angezogen und dann in gleichen Verhältnissen auf einer YNB+Trp+Ura- bzw. YEPD-Platte für drei Tage inkubiert. Die resultierenden Kolonien wurden zum einen im Durchlicht fotografiert, um die Koloniegrößen mit Hilfe der Software ImageJ zu bestimmen und zum anderen mit einem Plattenfluoreszenzmesser analysiert, um die Identität der einzelnen Kolonien an Hand der Emission bei 573 nm (RFP) oder 509 nm (GFP) zu ermitteln (Beispiel einer Platte mit roter und grüner Fluoreszenz neben der Tabelle). Es wurden alle sechs möglichen Kombinationen der drei Stämme und zwei Fluoreszenzen untersucht. Die Größe des *WHI3*-Stamms wurde jeweils auf 100% gesetzt und die relativen Koloniegrößen der verwendeten Stämme in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die Fehlerbalken sind ein Maß für die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens 50 Zellen.

Die Kultivierung der Stämme in flüssigem YEPD-Medium führte zu einer allgemeinen, gleichmäßigen Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit ohne die Verhältnisse zwischen dem *WHI3*- und *WHI3/WHI3*- bzw. dem *whi3Δ*- und *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm deutlich zu verändern. Um die Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Stämme auf Agarplatten zu messen, wurden der *WHI3*-, *whi3Δ*- und *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm zunächst mit einem GFP- oder RFP-exprimierenden Plasmid transformiert (Abb. 31B). Je ein RFP- und ein GFP-haltiger Stamm wurden einzeln in flüssigem YNB-Medium bis zur logarithmischen Phase angezogen, daraufhin in gleichen Verhältnissen miteinander vermischt und schließlich gemeinsam auf festem YNB- bzw. YEPD-Medium ausplattiert. Die Koloniegröße wurde nach zweitägigem Wachstum mit Hilfe der Software ImageJ ermittelt und die Identität der einzelnen Kolonien an Hand der GFP- bzw. RFP-Fluoreszenz bestimmt. Sowohl auf YNB- als auch auf YEPD-Platten sank die Koloniegröße des haploiden *whi3Δ*-Stamms auf 60% im Vergleich zum *WHI3*-Stamm, während die Größe des diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamms 80-90% betrug. Somit scheint der diploide *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm auf festem Medium geringfügig schneller als der

haploide *whi3Δ*-Stamm zu wachsen. Allerdings korrelieren die Genomduplikationsraten des haploiden *whi3Δ*-Stamms nicht mit den beobachteten Wachstumsgeschwindigkeiten des haploiden *whi3Δ*- bzw. diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamms auf den jeweiligen Medien. So verfügten der haploide und diploide *whi3Δ*-Stamm in flüssigem Medium über eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit, während in flüssigem YNB-Medium keine signifikante Anzahl von diploiden Zellen nach 72 Tagen zu beobachten war und in flüssigem YEPD-Medium eine komplette Konversion zu diploiden Zellen nach der gleichen Dauer festgestellt werden konnte. Des Weiteren genügt der Wachstumsvorteil des diploiden *whi3Δ/whi3Δ* auf festen Medien nicht aus, um die hohe Genomduplikationsrate des *whi3Δ*-Stamms auf festem YEPD-Medium im Gegensatz zu festem YNB-Medium zu erklären.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass Whi3 für die Ploidiestabilität benötigt wird und dass diese neue entdeckte Funktion von *WHI3* sowohl von Nährstoffsignalen als auch dem physikalischen Umfeld abhängt.

2.4.2 Herstellung einer konditionalen *whi3Δ*-Mutante

Da haploide *whi3Δ*-Stämme mit steigender Kultivierungsdauer diploidisieren könnten, sollte eine konditionale *whi3Δ*-Mutante mit Hilfe des TIPI-Systems generiert werden (Taxis et al., 2009). Diese Methode ermöglicht den schnellen proteasomalen Abbau von *WHI3* nach Galaktosegabe und verringert somit die Kultivierungsdauer und folglich auch die Wahrscheinlichkeit der Ploidiezunahme während der Herstellung von *WHI3*-defizienten Stämmen. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Degradationsvarianten getestet, bei denen Whi3 entweder N-terminal mit dem cODC-Degron (Variante 1) oder C-terminal mit dem TDegF-Degron (Variante 2) in YHUM216 markiert wurde (Abb. 32A). Der Ausgangsstamm YHUM216 enthält außerdem die Galaktose-induzierbare TEV-Protease, die in der Lage ist innerhalb der beiden TIPI-Markierungen zu schneiden und somit ein Degradationssignal freizulegen, welches schließlich zum proteasomalen Abbau von Whi3 führt (Abb. 32B). Auf diese Weise kann *WHI3* gezielt nach Galaktosegabe degradiert werden und die Kultivierungsdauer auf ein Minimum reduziert werden. Um die Funktionalität der *WHI3*-Konstrukte mit den beiden TIPI-Degrone zu testen, wurden die neu generierten Stämme einem Waschtest auf YEPD-Platten ohne Galaktose unterzogen (Abb. 32C, Daten für *WHI3*-TDeg nicht gezeigt). Trotz nicht-induzierender Bedingungen adhärten die mit dem TIPI-Degron markierten Stämme schlechter an Agarplatten als der unmarkierte *WHI3*-Kontrollstamm. Um einen frühzeitigen Abbau von *WHI3* aufgrund einer möglichen basalen

Expression der TEV-Protease auszuschließen, wurde außerdem ein *WHI3*-cODC-Stamm ohne TEV-Protease im Waschtest untersucht (-TEV).

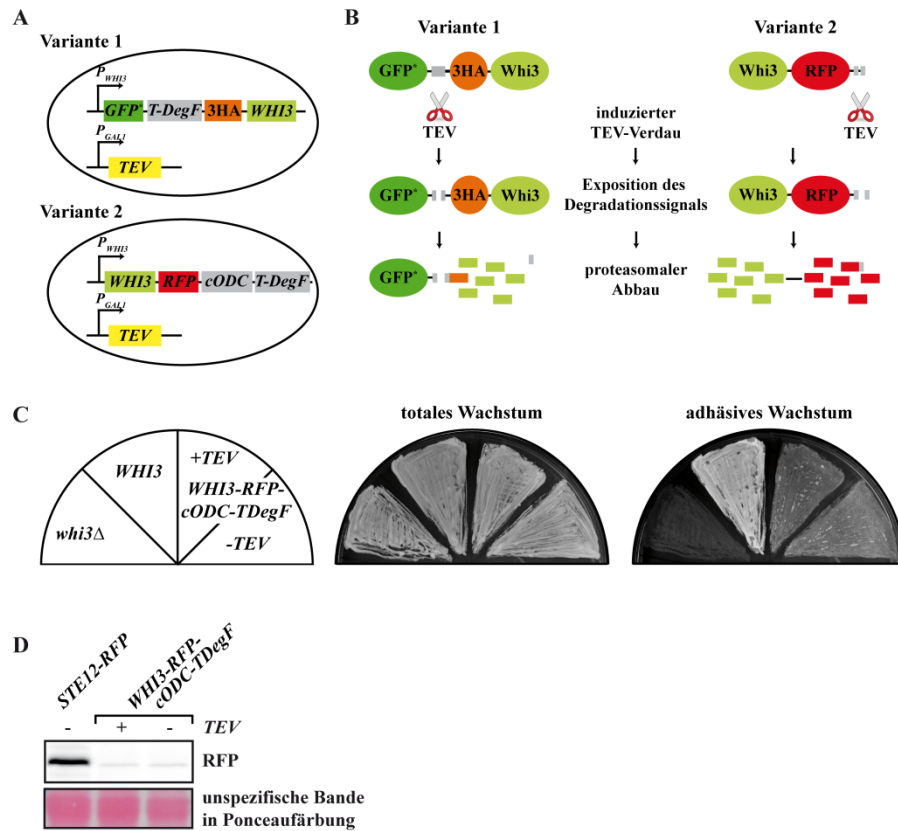


Abb. 32: Generierung einer konditionalen *whi3Δ*-Mutante mit Hilfe des TIPI-Systems.

(A) Schematische Darstellung der N- bzw. C-terminalen Markierungen von *WHI3* mit zwei verschiedenen TIPI-Degron-Varianten in den Hefestämmen YHUM2218 (*GFP*-TDegF-3HA-WHI3, TEV*) und YHUM2220 (*WHI3-tagRFP-cODC-TDegF, TEV*) zur Herstellung von konditionalen *whi3Δ*-Mutanten. (B) Übersicht über den induzierbaren Abbau der TIPI-markierten *WHI3*-Versionen aus (A). Galaktose-haltiges Medium induziert die Expression der TEV-Protease, welche in der Lage ist innerhalb der beiden TIPI-Markierungen zu schneiden und somit den proteasomalen Abbau von 3HA-Whi3 (Variante 1) bzw. von Whi3 und RFP (Variante 2) zu gewährleisten. (C) Zur Überprüfung der Funktionalität der markierten *WHI3*-Gene unter nicht-induzierenden Bedingungen wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1920 (*whi3Δ*), YHUM2220 (*WHI3-tagRFP-cODC-TDegF, TEV*) und YHUM2219 (*WHI3-tagRFP-cODC-TDegF*, ohne *TEV*) einem Adhäsionstest auf festem YEPD-Medium ohne Galaktose unterzogen. Nach fünftägigem Wachstum bei 30 °C wurden die Platten vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert. (D) Um die Expression des mit dem TIPI-Degron markierten RBPs unter nicht-induzierenden Bedingungen zu testen, wurden die Kontrollhefestämme YHUM1987 (*STE12-RFP*) und YHUM468 (*WHI3*) sowie der Hefestamm YHUM2218 (*GFP*-TDegF-3HA-WHI3, TEV*) nach dem Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium ohne Galaktose bis zur logarithmischen Phase einer Western-Analyse mit dem Primärantikörper anti-GFP unterzogen. Als Ladekontrolle dienten unspezifische Banden der Ponceaufärbung.

Allerdings adhärierte auch dieser Stamm deutlich schlechter als der *WHI3*-Kontrollstamm. Der Grund für diese Abnahme der Adhäsionsfähigkeit konnte schließlich in einer Western-Analyse ermittelt werden, in denen die Whi3-Fusionsproteine kaum detektierbare Mengen aufwiesen (Abb. 32D; Daten für *GFP*-TDegF-3HA-WHI3* nicht gezeigt). Offensichtlich führt

die Markierung von *WHI3* mit einer der beiden TIPI-Degrone zur verschlechterten Produktion oder Stabilität der Whi3-Fusionsproteine, was schließlich in einer verringerten Adhäsionsfähigkeit resultiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Herstellung einer konditionalen *whi3*-Mutante eingestellt und in allen nachfolgenden Experimenten lediglich frisch generierte *whi3* Δ -Stämme verwendet, um die Wahrscheinlichkeit der Ploidiezunahme zu minimieren und rein haploide *whi3* Δ -Stämme zu gewährleisten.

2.4.3 Die Genomduplikation des haploiden *whi3* Δ -Stamms supprimiert weder die Defekte der Biofilmbildung noch der Zellgröße, führt jedoch scheinbar zur Ploidiestabilität

In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Ploidiezunahme des *whi3* Δ -Stamms bestimmte Defekte der haploiden Mutanten ausgleichen kann. Zu diesem Zweck wurden die Biofilmbildung, Zellgröße und Ploidiestabilität des haploiden und diploiden *whi3* Δ -Stamms sowie der *WHI3*- und *WHI3/WHI3*-Kontrollstämme untersucht (Abb. 33).

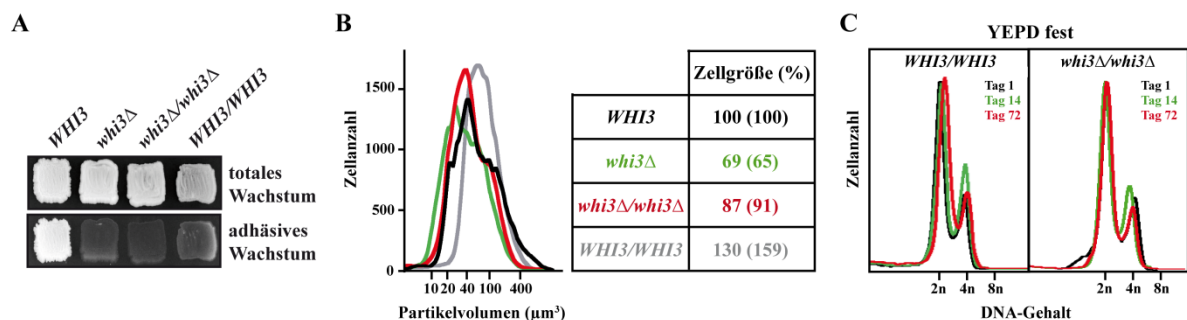


Abb. 33: Einfluss von *WHI3* und der Ploidie auf die Biofilmbildung, Zellgröße und Ploidiestabilität.

(A) Das adhäsive Wachstum der Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1920 (*whi3* Δ), YHUM2152 (*whi3* Δ /*whi3* Δ) und YHUM492 (*WHI3/WHI3*) wurde nach fünftägigem Wachstum auf festem YEPD-Medium bei 30 °C mit Hilfe eines Adhäsionstests bestimmt. Die Platten wurden vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) der Entfernung von nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen fotografiert. (B) Um die Zellgröße in Abhängigkeit der Ploidie zu bestimmen, wurden die Stämme aus (A) nach Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase mit Hilfe des Coulter Partikelanalysators sowie mikroskopischer Aufnahmen untersucht. Der Graph zeigt die absoluten Partikelvolumen der Coulter Analyse (je 20.000 Ereignisse) und die Tabelle die relative Zellgröße aus den Coulter (ohne Klammern) bzw. mikroskopischen (in Klammern) Untersuchungen. Dabei wurde der Wert des *WHI3*-Stamms jeweils auf 100% festgelegt. (C) Analyse der Ploidiestabilität der Hefestämme YHUM492 (*WHI3/WHI3*) und YHUM2152 (*whi3* Δ /*whi3* Δ) nach 72-tägiger Kultivierung auf festem YEPD-Medium. Alle zwei Tage wurden Aliquots auf frisches YEPD-Medium überführt und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für die FACS-Analyse zur Bestimmung des DNA-Gehalts entnommen. Durchführung und Analyse siehe Abb. 29 und 30. Für jeden Stamm ist der DNA-Gehalt nach Kultivierung für einen Tag (schwarz), 14 Tage (grün) und 72 Tage (rot) dargestellt. Die x-Achse gibt den DNA-Gehalt der Zellen an mit 2n und 4n für Diploide bzw. 4n und 8n für Tetraploide.

Zunächst wurde mit Hilfe eines Adhäsionstests an YEPD-Platten die Fähigkeit zur Biofilmbildung ermittelt. Den Erwartungen entsprechend adhärierte der *WHI3*-Kontrollstamm selbst nach stringentem Waschen an der Oberfläche, während der haploide *whi3Δ*-Stamm und der diploide *WHI3/WHI3*-Stamm nicht zur Adhäsion befähigt waren. Auch der *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm konnte von der Oberfläche gewaschen werden, was darauf hindeutet, dass *WHI3* sowohl in haploiden als auch diploiden Zellen für die Biofilmbildung benötigt wird (Abb. 33A). Die Analyse der Zellgröße erfolgte mit Hilfe eines Coulter Partikelanalysators und zusätzlichen mikroskopischen Aufnahmen. In Übereinstimmung mit früheren Daten wies der diploide *WHI3/WHI3*-Stamm ein ca. 1,3-fach größeres Zellvolumen als der haploide *WHI3*-Stamm auf (Abb. 33B) (Weiss et al., 1975; Galitski et al., 1999). Die Abwesenheit von *WHI3* führte zwar zu einer generellen Reduktion des Zellvolumens, allerdings blieb das Verhältnis von diploiden zu haploiden Zellen auch im *whi3Δ*-Hintergrund erhalten. Dies deutet darauf hin, dass *Whi3* und der Ploidiegehalt unabhängig voneinander die Zellgröße bestimmen können und die Ploidieerhöhung den Zellgrößendefekt der *whi3Δ*-Mutante nicht supprimieren kann. Zur Untersuchung der Ploidiestabilität wurden der diploide *WHI3/WHI3*- und *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm analog zu Abb. 32 für 72 Tage auf festem YEPD-Medium kultiviert, da unter dieser Bedingung die höchste Genomduplikationsrate des haploiden *whi3Δ*-Stamms beobachtet werden konnte (Abb. 30C). Doch selbst nach 72 Tagen konnten in keinem der beiden Stämme 8n-haltige Zellen und somit keine weitere Verdopplung des DNA-Gehalts beobachtet werden. Folglich scheint die Genomduplikation zur Stabilisierung der Ploidie geführt zu haben und die Abwesenheit von *WHI3* bezüglich dieses Defektes supprimiert zu haben.

2.4.4 *Whi3* wird ebenfalls posttranskriptionell in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen reguliert.

Um herauszufinden, wie *Whi3* die Ploidiestabilität in Abhängigkeit der Nährstoffbedingungen und dem physikalischen Umfeld regulieren könnte, sollte zunächst untersucht werden, ob bzw. inwiefern die unterschiedlichen, hier getesteten Kultivierungsbedingungen *Whi3* selbst beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde *WHI3* C-terminal mit *9MYC* oder *GFP* markiert und die resultierenden Stämme unter den beiden Bedingungen angezogen, unter denen der haploide *whi3Δ*-Stamm die höchste bzw. niedrigste Genomduplikationsrate aufwies (siehe Abb. 30). Daraufhin wurden die *Whi3*-markierten Stämme in flüssigem YNB-Medium (geringste Genomduplikationsrate) oder auf festem YEPD-Medium (höchste

Genomduplikationsrate) für zwei Tage inkubiert, Aliquots in bzw. auf frisches Medium überführt und für weitere zwei Tage kultiviert (vergleiche Abb. 30). Anschließend wurden quantitative Northern- und Western-Analysen durchgeführt. Dabei diente in der Transkriptanalyse Methylenblau als Ladekontrolle, da die *ACT1*-mRNA-Mengen nach dem Wachstum auf festem YEPD-Medium stark sanken, obwohl ähnliche Mengen Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Die Methylenblaufärbung zeigte jedoch gleichmäßige rRNA-Mengen und wurde somit erfolgreich für die Normalisierung verwendet. Die Kultivierung auf festem YEPD-Medium führte zu keiner signifikanten Änderung der *WHI3-9MYC*- bzw. *WHI3-GFP*-Transkriptmengen, während die jeweiligen Proteinmengen unerwarteter Weise auf ca. 40% sanken (Abb. 34).

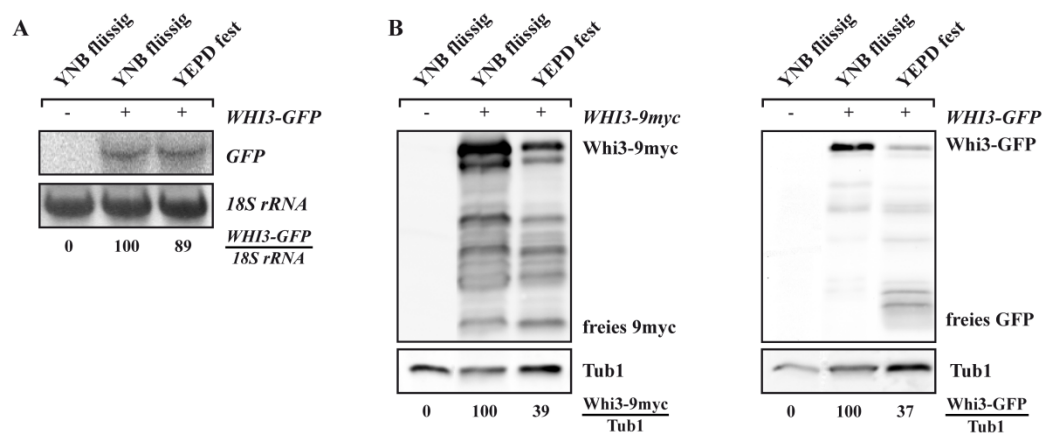


Abb. 34: Whi3 unterliegt einer posttranskriptionellen Regulation in Abhängigkeit von den Wachstumsumsbedingungen.

(A) Zur Bestimmung der *WHI3*-Expression wurden der Kontrollhefestamm YHUM468 (*WHI3*) sowie die Hefestämme YHUM2223 (*WHI3-9myc*) und YHUM1627 (*WHI3-GFP*) in flüssigem YNB+Trp+Ura-Medium oder auf festem YEPD-Medium für zwei Tage inkubiert, Aliquots in bzw. auf frisches Medium überführt und für weitere zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde eine quantitative Northern-Analyse von YHUM1627 und YHUM468 mit einer radioaktiv markierten *GFP*-DNA-Sonde durchgeführt und die rRNA mit Hilfe von Methylenblau gefärbt. Die Zahlen geben relative *WHI3-GFP*-mRNA Werte nach der Normalisierung mit der *18S rRNA* an, wobei der Wert von YHUM1627 in flüssigem YNB -Medium auf 100% festgelegt wurde. (B) Nach der in (A) beschriebenen Inkubation wurden die Kulturen außerdem quantitativen Western-Analysen mit den Primärantikörpern anti-GFP bzw. anti-myc und anti-Tubulin unterzogen. Die Zahlen geben relative Whi3-9myc- bzw. Whi3-GFP-Werte nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle Tubulin (*Tub1*) an, wobei der Wert des *WHI3-9myc*- bzw. *WHI3-GFP*-Stamms in flüssigem YNB-Medium erneut auf 100% festgelegt wurde.

Diese negative posttranskriptionelle Regulation scheint zunächst widersprüchlich, da das RBP für die Ploidiestabilität beim Wachstum auf festem YEPD-Medium benötigt wird. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass Whi3 einer zusätzlichen posttranslationellen Regulation unterliegen könnte, um seine Aktivität trotz verminderter Proteinmengen zu erhalten bzw. zu erhöhen. Solche posttranslationellen Modifikationen von RBPs sind typischer Weise

SUMOylierungen, Arginin-Methylierungen oder Phosphorylierungen (Glisovic et al., 2008). Allerdings konnte an Hand der Western-Analyse kein signifikanter Unterschied im Laufverhalten der Whi3-Fusionsproteine unter den beiden Kultivierungsbedingungen festgestellt werden, was z. B. auf eine SUMOylierung (ca. 12 kDa) hindeuten würde. Eine mögliche Arginin-Methylierung oder Phosphorylierung muss in weiteren Experimenten untersucht werden, da diese mit Hilfe der hier durchgeführten Western-Analyse nicht eindeutig identifiziert werden können.

2.4.5 Whi3 kontrolliert die Expression der Dynaktinuntereinheit Nip100 auf posttranskriptioneller Ebene

Da die erhöhte Genomduplikationsrate der *whi3Δ*-Mutante auf Defekte in der Chromosomenverteilung schließen lassen, wurden Gene gesucht, die mit Whi3 genetisch interagieren und an der Chromosomensegregation beteiligt sind. Ein vielversprechender Kandidat ist *NIP100*, das für eine Untereinheit des Dynaktinkomplexes kodiert. Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, führt die Deletion von *NIP100* zu lebensfähigen Zellen mit einer erhöhten Frequenz fehlgeschlagener, interner Mitosen, bei denen die Chromatidenverteilung und Spindelpolelongation auf die Mutterzelle beschränkt sind (Kahana et al., 1998). Dies resultiert schließlich in Mutterzellen mit doppelten Chromosomensätzen und nicht-lebensfähigen Tochterzellen ohne Genom. Um eine mögliche Epistasie zwischen *WHI3* und *NIP100* zu untersuchen, wurde *NIP100* genomisch, C-terminal im *WHI3*-, *whi3Δ*- und *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm mit *6HA* markiert und die Transkript- und Proteinmengen des Fusionskonstruktes in Abhängigkeit von *WHI3*, der Ploidie und den Wachstumsbedingungen untersucht (Abb. 35A und B). Die Messungen wurden zum einen in flüssigem Minimalmedium (YNB) durchgeführt, das nur geringfügig die Genomduplikation von haploiden *whi3Δ*-Mutanten induziert, und zum anderen auf festem Vollmedium, bei dem die höchste Genomduplikationsrate gemessen wurde (siehe Abb. 30). Um den tatsächlichen posttranskriptionellen Einfluss von *WHI3* darzustellen, wurden außerdem die entsprechenden Protein/mRNA-Verhältnisse bestimmt (Abb. 35C). In flüssigem Minimalmedium sank das Nip100-Protein/mRNA Verhältnis der haploiden und diploiden *whi3Δ*-Mutante auf ca. 80%. Das Wachstum auf YEPD-Platten hingegen führte bereits im *WHI3*-Stamm zu einer Abnahme des Nip100-Protein/mRNA Verhältnisses auf 40% und im *whi3*-Hintergrund zu einem weiteren Absinken auf ca. 15%. Dabei scheint der Ploidiegehalt erneut keinen Einfluss auf die Nip100-Protein/mRNA-Werte auszuüben.

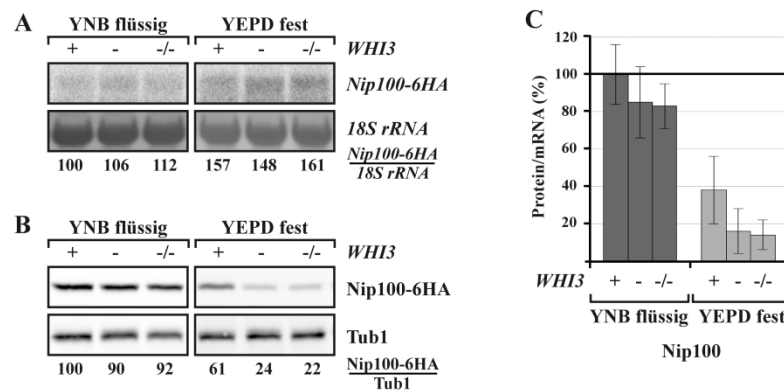


Abb. 35: Whi3 kontrolliert *NIP100*, die Untereinheit des Dynaktinkomplexes, auf posttranskriptioneller Ebene in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen.

(A) Zur Bestimmung des Einflusses von *WHI3*, der Ploidie und der Wachstumsbedingungen auf *NIP100* wurden die Hefestämme YHUM2213 (*NIP100-6HA*, *WHI3*), YHUM2214 (*NIP100-6HA*, *whi3Δ*) und YHUM2215 (*NIP100-6HA/NIP100-6HA*, *whi3Δ/whi3Δ*) in flüssigem YNB+Trp+Ura-Medium oder auf festem YEPD-Medium für zwei Tage inkubiert, Aliquots in bzw. auf frisches Medium überführt und für weitere zwei Tage kultiviert. Anschließend wurde eine quantitative Northern-Analyse mit einer radioaktiv markierten *NIP100*-DNA-Sonde durchgeführt und die rRNA mit Hilfe von Methylenblau gefärbt. Die Zahlen geben relative *NIP100-6HA*-Transkriptwerte nach der Normalisierung mit der *18S rRNA* an, wobei der Wert von YHUM2213 in YNB-Medium auf 100% festgelegt wurde. (B) Nach der in (A) beschriebenen Inkubation wurden die Kulturen außerdem quantitativen Western-Analysen mit den Primärantikörpern anti-HA und anti-Tubulin unterzogen. Die Zahlen geben relative Nip100-6HA-Werte nach der Normalisierung mit der Ladekontrolle Tubulin (Tub1) an, wobei der Wert von YHUM2213 für das Wachstum in YNB-Flüssigmedium erneut auf 100% gesetzt wurde. (C) Um den posttranskriptionellen Einfluss von *WHI3* auf *NIP100* deutlicher darzustellen, wurden die relativen *NIP100*-Transkript- und Nip100-Proteinwerte aus (A) und (B) in einem Quotienten (Protein/mRNA) zusammengefasst. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die *NIP100*-Expression hauptsächlich durch *WHI3* und die Wachstumsbedingungen reguliert wird und nicht vom Ploidiegrad abhängt. Nip100 könnte einen potentiellen Effektor von Whi3 zur Regulation der Ploidiestabilität darstellen.

2.4.6 Whi3 ist ein globaler Regulator von Genen des Zellzyklus, der Schwesterchromatidkohäsion und der Stressantwort

Um weitere mögliche Mechanismen der Ploidiekontrolle zu identifizieren, sollten die Auswirkungen der *WHI3*-Deletion in haploiden Zellen und der Einfluss der anschließenden Genomduplikation auf die generelle Genexpression untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden globale Transkriptprofile vom haploiden *WHI3*- (YHUM468) und *whi3Δ*- (YHUM1921) Stamm sowie vom diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm (YHUM2152) nach der Anzucht in flüssigem YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase durchgeführt. Die mindestens zweifach differentiell exprimierten Gene zwischen dem *WHI3*- und *whi3Δ*-

Stamm (Abb. 36, blau) sowie dem *whi3Δ*- und *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm (Abb. 36, rot) waren Grundlage zur Erstellung eines Venn-Diagramms.

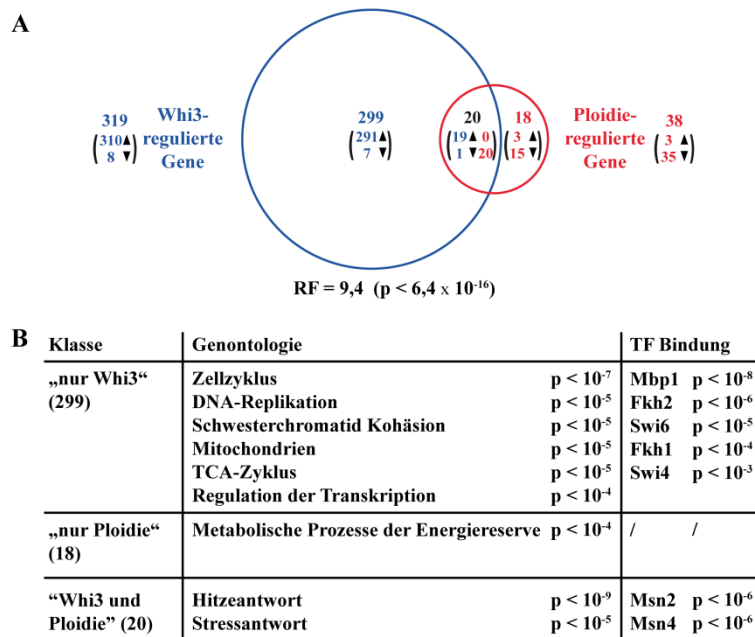


Abb. 36: Identifizierung von Whi3- und Ploidie-regulierten Genen mit Hilfe von globalen Transkriptanalysen.

(A) Das Venn-Diagramm zeigt die mindestens zweifach differentiell exprimierte Gene zwischen den Hefestämmen YHUM468 (*WHI3*) und YHUM1920 (*whi3Δ*) (blau) bzw. YHUM1920 (*whi3Δ*) und YHUM2152 (*whi3Δ/whi3Δ*) (rot) nach Wachstum in YNB+Trp+Ura-Medium bis zur logarithmischen Phase. Die Anzahl der Gruppen-spezifischen und überlappenden Gene sind angegeben. Des Weiteren sind der Repräsentationsfaktor (RF), der die Anzahl von gemeinsam regulierten Genen bei zufälliger Probennahme berechnet, und die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) für die jeweilige Schnittmengengröße unter den vorliegenden Bedingungen aufgeführt. (B) Die drei Klassen „nur Whi3-“, „nur Ploidie-“ und „Whi3- und Ploidie-“ regulierter Gene wurden einer Genontologie- (GO-) Analyse mit dem Ceres-Server (Morris *et al.*, 2010) unterzogen, um Prozesse zu identifizieren, die statistisch signifikant durch die jeweiligen Parameter reguliert werden ($p < 10^{-4}$). Außerdem wurden die Genklassen hinsichtlich der Akkumulation von Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der Ceres Software untersucht (bis zu 1000 bp stromaufwärts des jeweiligen ATGs). Die Wahrscheinlichkeiten (p-Werte) für die jeweiligen Anreicherungen bei zufälliger Probennahme sind angegeben.

Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Whi3 insgesamt 319 Gene signifikant regulieren könnte. Interessanter Weise stieg die Expression der meisten Gene (310) nach Deletion von *WHI3*, was darauf schließen lässt, dass Whi3 einen vorrangig negativen Einfluss auf die Transkription ausübt. Dies korreliert ebenfalls mit den Ergebnissen der in Abb. 21, 23, 25 und 35 durchgeführten Northern-Analysen, in denen die Transkripte im *whi3Δ*-Hintergrund tendenziell gestiegen sind. Des Weiteren konnten 38 Gene identifiziert werden, die beim Vergleich des haploiden *whi3Δ*- und diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamms mindestens zweifach differentiell exprimiert werden und somit in Abwesenheit von *WHI3* durch die Ploidie kontrolliert werden. Bemerkenswerter Weise regulierte Whi3 ebenfalls 20 der 38

Ploidie-abhängigen Gene. Die hohe Signifikanz dieser Koregulation wird an Hand des Repräsentationsfaktors von 9,4 und einer Wahrscheinlichkeit von $6,4 \times 10^{-16}$ deutlich und zeigt, dass Whi3 einen überdurchschnittlich hohen Einfluss auf Ploidie-regulierte Gene hat. Es fällt außerdem auf, dass die Genomduplikation des haploiden *whi3Δ*-Stamms zu sinkenden Transkriptmengen von 35 der 38 Ploidie-regulierten Gene führte. Folglich scheint die Ploidie im Gegensatz zu Whi3 einen tendenziell positiven Einfluss auf die Transkription auszuüben. Analog zu Abb. 15 wurden die mindestens zweifach regulierten Gene mit Hilfe der Internet-basierten Ceres-Software (Morris et al., 2010) in funktionell annotierte Kategorien (Gentontologien) eingeteilt ($p < 10^{-4}$) und hinsichtlich der Anreicherung bestimmter Transkriptionsfaktorbindestellen in ihren Promotoren (bis zu 1000 bp stromaufwärts; $p < 10^{-4}$) untersucht. Dabei wurden sowohl experimentell validierte als auch bioinformatisch vorausgesagte Transkriptionsfaktorbindestellen berücksichtigt. Dies ermöglichte die Identifizierung von putativen Effektoren von Whi3 und von Signalnetzwerken, in die Whi3 involviert sein könnte. Die Ergebnisse dieser Analysen werden in den folgenden drei Abschnitten näher beschrieben.

„Nur Whi3-“ regulierte Gene

Zunächst wurden diejenigen Gene einer detaillierteren Analyse unterzogen, die ausschließlich durch Whi3 reguliert werden (299). Dabei konnte eine signifikante Anreicherung ($p < 10^{-4}$) von Zellzyklus-Genen und den Zellzyklus-Regulatoren MBF (Mbp1 und Swi6), SBF (Swi4 und Swi6), Fkh1 und Fkh2 beobachtet werden. Obwohl die Anreicherung für Swi4 mit $p < 10^{-3}$ leicht unterhalb des gewählten Schwellenwertes lag, wurde es trotzdem mit in die Analyse aufgenommen, da Swi4 zusammen mit Swi6 den G1/S-Regulator SBF bildet. Die nähere Analyse der 37 angereicherten Zellzyklusgene an Hand von genomweiten Transkriptanalysen verschiedener Zellzyklusphasen ergab, dass 14 dieser Gene in der G1-Phase, eins in der S-Phase, zwei in der G2-Phase und sieben in der M-Phase induziert werden, während 13 kein spezifisches Expressionsmuster aufwiesen. Diese Befunde bestätigen zum einen die Beteiligung von Whi3 an der Zellzykluskontrolle und legen außerdem den Schluss nahe, dass Whi3 neben Cln3 und dem G1/S-Übergang auch weitere Faktoren und Phasen des Zellzyklus beeinflussen könnte. Des Weiteren führte die Deletion von *WHI3* zu einer zweifachen, transkriptionellen Induktion von Genen, die in die Schwesterchromatid-kondensation und -kohäsion involviert sind (Nasmyth and Haering, 2009). Diese kodieren sowohl für Kernkomponenten des Kohäsionskomplexes (*SMC1*, *SMC3*, *MCD1*, *IRRI*) als auch für essentielle, regulatorische Faktoren der Kohäsion (*ECO1*, *SCC2*, *PDS1*) (Abb. 37A).

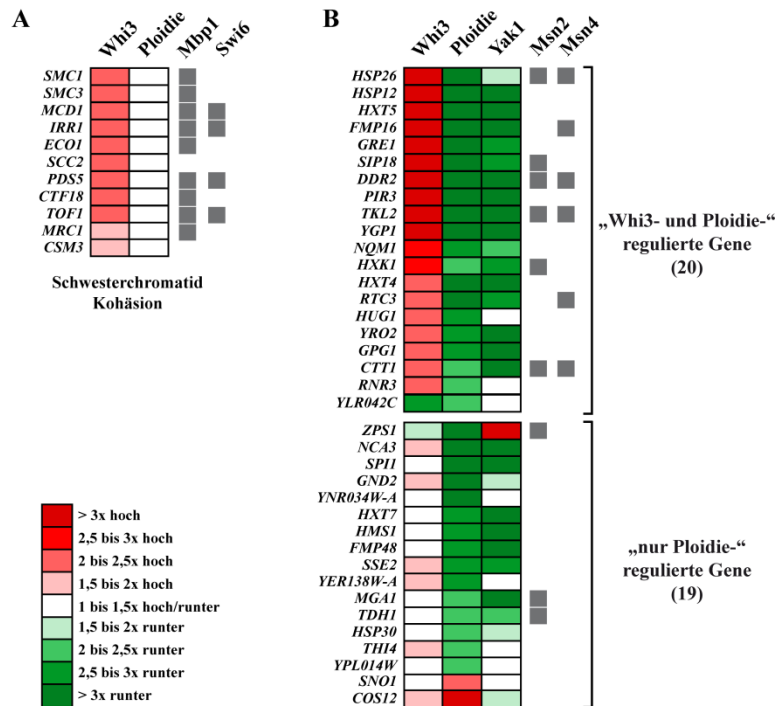


Abb. 37: Die Deletion von *WHI3* führt zur erhöhten Expression von Genen der Schwesterchromatidkohäsion.

Detaillierte Expressionsänderung ausgesuchter Gene in Abhängigkeit von *WHI3* und der Ploidie aus der globalen Transkriptanalyse in Abb. 36. **(A)** Das Gencluster wird durch *WHI3* aber nicht durch die Ploidie reguliert und ist in die Schwesterchromatidkohäsion involviert. Die Gene zeigen eine starke Anreicherung durch die Transkriptionsfaktoren Mbp1 und Swi6 (graue Kästchen). **(B)** Genexpressionsänderung in den Genklassen „Whi3- und Ploidie-“ und „nur Ploidie-“ regulierter Gene sowie die Regulation durch Yak1 (Abb. 15; Malcher et al., 2011). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4 ist in grau dargestellt. Die Änderung der Genexpression in (A) und (B) ist farblich dargestellt und erfolgte durch den Vergleich des *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamms (Whi3), des haploiden *whi3Δ*- und diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamms (Ploidie) bzw. eines Stamms, der *YAK1* überexprimiert, und einem *yak1Δ*-Stamm (Yak1) (Farbcode siehe links unten).

Diese Gene zeigten außerdem eine Anreicherung für die Transkriptionsfaktoren Mbp1 und Swi6, was die Vermutung nahe legt, dass Whi3 die Kohäsion ebenfalls über MBF (Mbp1-Swi6) kontrollieren könnte. Die Involvierung von Whi3 in die Regulation von Kohäsingenen könnte eine weitere Ursache für die gesteigerte Genomduplikationsrate des haploiden *whi3Δ*-Stamms sein. Demnach könnte die erhöhte Expression der Kohäsingene im *whi3Δ*-Hintergrund zum verstärkten Zusammenhalt der Schwesterchromatiden führen und somit eine erschwerte Trennung und ineffiziente Verteilung der Chromosomen auf die Mutter- und Tochterzelle bedingen. Des Weiteren konnte eine Anreicherung von Genen der Transkriptionsregulation festgestellt werden, was in Übereinstimmung mit der Beobachtung steht, dass die Abwesenheit von *WHI3* tendenziell zu steigenden Transkriptmengen führte. Darüber hinaus resultierte die Deletion von *WHI3* in der Induktion von diversen Genen, die

mit den Mitochondrien assoziiert sind und zum Teil am TCA-Zyklus beteiligt sind. Dies deutet darauf hin, dass Whi3 mitochondriale Funktionen negativ beeinflussen könnte.

„Nur Ploidie-“ regulierte Gene

Die Analyse der ausschließlich durch die Ploidie regulierten Gene (18) ergab eine Anreicherung für metabolische Prozesse der Energiereserve (Abb. 37B). Dies unterstützt andere Publikationen, in denen die metabolische Rate ebenfalls in Abhängigkeit des Ploidiegrades steigt (Lamprecht et al., 1976; Salmon, 1997). Allerdings konnten für dieses Gencluster keine Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die eine vermehrte Bindung an die Promotoren dieser Gene aufweisen. Folglich gibt die Transkriptanalyse keine Aufschlüsse über mögliche Effektoren, über die eine Ploidieänderung vermittelt werden könnte.

„Whi3- und Ploidie-“ regulierte Gene

Die durch Whi3 und die Ploidie gemeinsam regulierten Gene wiesen eine hohe Anreicherung von Genen der allgemeinen Hitze- und Stressantwort sowie für die Transkriptionsfaktoren Msn2/4 auf (Abb. 36B). Diese putativen Whi3-Zielgene umfassten u. a. die für Hitzeschockfaktoren kodierenden *HSP26* und *HSP12* sowie das für ein Multistressprotein kodierende *DDR2* (Petko and Lindquist, 1986; Praekelt and Meacock, 1990; Kobayashi et al., 1996; Amorós and Estruch, 2001). Interessanter Weise übten Whi3 und die Ploidie jedoch gegensätzliche Einflüsse auf diese Gene aus. Während die Deletion von *WHI3* die Expression dieser Stressgene ca. zwei- bis dreifach induzierte, revertierte die anschließende Genomduplikation des *whi3Δ*-Stamms diesen Effekt und führte zur Reduktion der Transkriptmengen auf Werte des haploiden *WHI3*-Ausgangsstamms (Abb. 37B). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Abwesenheit von *WHI3* ein zelluläres, Msn2/4-vermitteltes Stresssignal auf transkriptioneller Basis generieren könnte, das durch die Genomduplikation partiell aufgehoben werden kann. Dieses Signal scheint jedoch nicht über den Yak1-Msn2/4-Zweig weitergeleitet zu werden. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Abwesenheit von *YAK1* zwar ebenfalls 15 der 20 „Whi3- und Ploidie-“, regulierten Gene beeinflusst, allerdings wirken sich die Deletionen von *WHI3* und *YAK1* gegensätzlich auf diese Gene aus (Abb. 37B). Da Whi3 die Proteinkinase Yak1 jedoch positiv reguliert, scheint Whi3 in der Lage zu sein, die Stressantwort auch über weitere, Yak1-unabhängige Mechanismen zu steuern. Alternativ könnte die Induktion der Stressgene indirekt erfolgen und durch generelle, zelluläre Defekte infolge der *WHI3*-Deletion hervorgerufen werden, die eine transkriptionelle Stressantwort in Abwesenheit von Stressbedingungen erzeugen.

2.4.7 Die Genomduplikation des haploiden *whi3Δ*-Stamms erhöht geringfügig die Resistenz gegenüber Zellwandstress, nicht jedoch gegenüber Hitzestress oder translationellen Inhibitoren.

Das Transkriptprofil der haploiden und diploiden *whi3Δ*-Mutante legt den Schluss nahe, dass die Deletion von *WHI3* ein Stresssignal innerhalb der Zelle hervorruft, welches infolge der Genomduplikation aufgehoben werden kann. Aufgrund dessen sollte in einem Tropftest untersucht werden, ob die vollzogene Ploidieerhöhung im diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm in der Lage ist bekannte Sensitivitäten des haploiden *whi3Δ*-Stamms zu supprimieren. Zu diesem Zweck wurden die Sensitivitäten der *WHI3*- und *WHI3/WHI3*-Kontrollstämme sowie der *whi3Δ*- und *whi3Δ/whi3Δ*-Stämme gegenüber verschiedenen Translationsinhibitoren, Hitzestress sowie Zellwandstress („Calcofluor White“) bestimmt (Abb. 38).

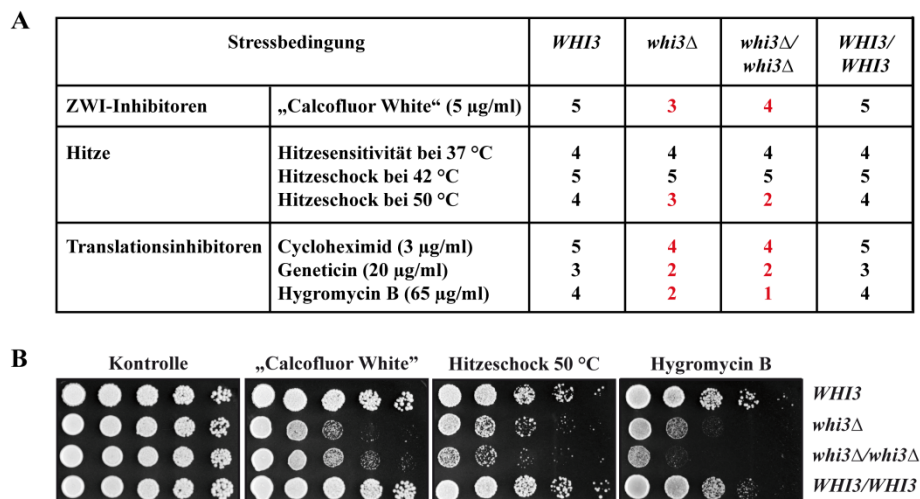


Abb. 38: Auswirkung der Ploidieerhöhung im *whi3Δ*-Hintergrund auf die Sensitivität gegenüber diversen Stressbedingungen.

(A) Um die Sensitivität gegenüber Zellwandintegritäts- (ZWI-) Inhibitoren, Hitzestress und Translationsinhibitoren in Abhängigkeit von *WHI3* und der Ploidie zu bestimmen, wurden die Hefestämme YHUM468 (*WHI3*), YHUM1920 (*whi3Δ*), YHUM2152 (*whi3Δ/whi3Δ*) und YHUM492 (*WHI3/WHI3*) nach dem Wachstum in YEPD-Medium bis zur logarithmischen Phase auf festem YEPD-Medium ohne (Kontrolle) oder mit verschiedenen Additiven für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Platten wurden entweder mit 5 µg/ml „Calcofluor White“ zur Induktion von Zellwandstress oder mit den Translationsinhibitoren Cycloheximid (3 µg/ml), Geneticin (20 µg/ml) oder Hygromycin B (65 µg/ml) supplementiert. Außerdem wurde die Hitzesensitivität der Kulturen nach dreitägiger Inkubation der Platten bei 37 °C statt 30 °C untersucht. Ferner wurden die Stämme für 30 min einem Hitzeschock bei 42 °C oder 50 °C ausgesetzt und anschließend auf festem YEPD-Medium für drei Tage bei 30 °C kultiviert. In der Tabelle sind die Sensitivitäten der einzelnen Stämme an Hand einer Skala von 1 (hohe Sensitivität) bis 5 (niedrige Sensitivität) dargestellt. Dabei kennzeichnen rote Zahlen eine höhere Sensitivität im Vergleich zum *WHI3*-Kontrollstamm. (B) Tropftests ausgewählter Bedingungen aus (A), unter denen die Sensitivität des *whi3Δ*-Stamms eine geringfügige Abhängigkeit von der Ploidie zeigte.

Zur Simulation von Hitzestress wurden die Stämme konstant bei 37 °C statt 30 °C inkubiert oder einem 30-minütigem Hitzeschock bei 42 °C bzw. 50 °C ausgesetzt. Die *WHI3*- und *WHI3/WHI3*-Kontrollstämme zeigten keinerlei Wachstumsunterschiede unter den drei getesteten Bedingungen, was darauf hindeutet, dass die Ploidie keinen direkten Einfluss auf die Hitzeantwort in Anwesenheit von *WHI3* ausübt. Des Weiteren führte weder die konstante Inkubation bei 37 °C noch der Hitzeschock bei 42 °C zu sichtbaren Wachstumsdefekten des *whi3Δ*- oder *whi3Δ/whi3Δ*-Stamms. Dahingegen resultierte die Deletion von *WHI3* in einer erhöhten Sensitivität der *whi3Δ*-Mutante infolge eines Hitzeschocks bei 50 °C, während der *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm entgegen den Erwartungen eine weitere Sensitivitätssteigerung aufwies. In Gegenwart verschiedener Inhibitoren der Translationselongation zeigten sowohl der haploide als auch der diploide *WHI3*-Stamm ähnliche, leicht erhöhte Wachstumsdefekte. Diese Defekte prägten sich in Abwesenheit von *WHI3* weiter aus, konnten jedoch nicht durch die Genomduplikation supprimiert werden. Stattdessen schien der *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm sogar noch etwas sensibler gegenüber Hygromycin B zu sein als der haploide *whi3Δ*-Stamm, während sich die Sensitivitäten der beiden *WHI3*-defizienten Stämme gegenüber den anderen beiden Inhibitoren nicht veränderte. Zur Simulation von Zellwandstress wurden die Stämme ferner dem Zellwandinterkalator „Calcofluor White“ ausgesetzt. Während die *WHI3*- und *WHI3/WHI3*-Kontrollstämme keine sichtbaren Wachstumsdefekte aufwiesen, führte die Deletion von *WHI3* in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten zu einer erhöhten Sensitivität (Ragni et al., 2011). Die Genomduplikation des *whi3Δ*-Stamms ermöglichte eine sehr geringfügige Steigerung der Resistenz gegenüber „Calcofluor White“. Zusammenfassend scheint der Ploidiegrad nur in Abwesenheit von *WHI3* in der Lage zu sein, die Sensitivität der Stämme gegenüber den hier getesteten Stressbedingungen zu beeinflussen. Dabei verschlechterte eine Ploidieerhöhung zwar geringfügig die Resistenz gegenüber Hygromycin B oder Hitzestress, wirkte sich jedoch andererseits leicht positiv auf die Resistenz gegenüber Zellwandstress in Form von „Calcofluor White“ aus. Allerdings führte die Genomduplikation unter keiner der hier getesteten Bedingungen zu einer vollständigen Suppression der Wachstumsdefekte der *whi3Δ*-Mutante. Folglich wird *WHI3* sowohl in haploiden als auch in diploiden Zellen für eine vollständige Resistenz gegenüber Translationsinhibitoren, Hitzestress sowie Zellwandstress benötigt.

3 DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das RNA-Bindeprotein (RBP) Whi3 nicht nur in die Kontrolle der Zellgröße, Biofilmformation und Stressantwort involviert ist, sondern ebenfalls maßgeblich zur Ploidiestabilität beiträgt. Die hier gewonnenen Daten deuten ferner darauf hin, dass Whi3 diese vielfältigen Funktionen durch Bereitstellung ausreichender Proteinmengen von diversen Schlüsselfaktoren ermöglichen könnte. Auf diese Weise wäre das RBP in der Lage die Effektivität und Kapazität ganzer Signalnetzwerke des zellulären Wachstums und der Entwicklung zu fördern.

Im Folgenden sollen die jeweiligen Rollen von Whi3 während der Regulation der Zellgröße, Ploidiestabilität, Biofilmbildung und Stressantwort detaillierter behandelt werden und mögliche molekulare Mechanismen der Whi3-Kontrolle diskutiert werden.

3.1 Kontrolle der Zellgröße durch Whi3

Vorangegangene Arbeiten postulieren, dass Whi3 den G1/S-Phase Übergang kontrolliert und somit zur Regulation der Zellgröße beiträgt (Garí et al., 2001; Nash et al., 2001). Dabei soll Whi3 durch cytoplasmatische Retention des Cdc28-Cln3 Komplexes die Passage durch Start verzögern. Nach der Entlassung von Cdc28-Cln3 aktiviert dieser Komplex im Kern die Transkription des sogenannten G1-Clusters durch die Transkriptionsfaktorkomplexe MBF (Mbp1-Swi6) und SBF (Swi4-Swi6) und initiiert somit den Start eines neuen Zellzyklus (Enserink and Kolodner, 2010). Diese Theorie konnte in dieser Arbeit mit Hilfe des globalen Transkriptprofils unterstützt werden, da Whi3 die Expression diverser G1-spezifischer MBF- und SBF-regulierter Gene negativ beeinflusst. Dies wird wahrscheinlich indirekt durch die Inhibierung von Cdc28-Cln3 erreicht. Alternativ wäre auch eine direkte, posttranskriptionelle Regulation von MBF und SBF durch Whi3 denkbar, was eine weitere Möglichkeit zur Feinabstimmung des Zellzyklus darstellen würde. Darüber hinaus ist Whi3 jedoch ebenso in der Lage die Expression der G1-Cycline Cln1 und Cln2 auf posttranskriptioneller Ebene zu fördern. Dabei konnte der Einfluss von Whi3 auf Cln2 jedoch erst nach der fast vollständigen Deletion des *CLN2*-ORFs gezeigt werden, was auf zusätzliche konkurrierende Regulationsmechanismen hindeutet, welche die Whi3-Kontrolle unter den getesteten Bedingungen überdecken könnten. Eventuell wird Cln2 erst unter bestimmten Bedingungen durch Whi3 reguliert. Frühere Arbeiten zeigen, dass die Cln1- und Cln2-Mengen direkt mit

der Zellgröße korrelieren und die jeweilige Überexpression dieser beiden G1-Cycline in einer Zunahme des Zellvolumens resultiert, während die Einzeldelationen zu kleineren Zellen führen (Tyers et al., 1993; Queralt and Igual, 2004). Folglich könnte Whi3 in der Lage sein durch posttranskriptionelle Förderung der G1-Cycline Cln1 und Cln2 die G1/S-Transition zu beschleunigen. Zusammenfassend legen diese Daten den Schluss nahe, dass Whi3 sowohl inhibierend als auch aktivierend auf die Zellzyklusprogression einwirken könnte (Abb. 37). Dieser Mechanismus scheint zunächst widersinnig zu sein, könnte jedoch dazu beitragen, dass die Zellen kritische Größen weder unter- noch überschreiten. In diesem Sinne könnte die Verzögerung der G1/S-Transition durch Inhibierung des Cdc28-Cln3-Komplexes zunächst ausreichend Zeit zum Zellwachstum gewährleisten, während die anschließende Beschleunigung durch Bereitstellung distinkter Mengen Cln1 und Cln2 einen zügigen Ablauf des Zellzyklus ermöglicht, sobald der Startpunkt überschritten wurde.

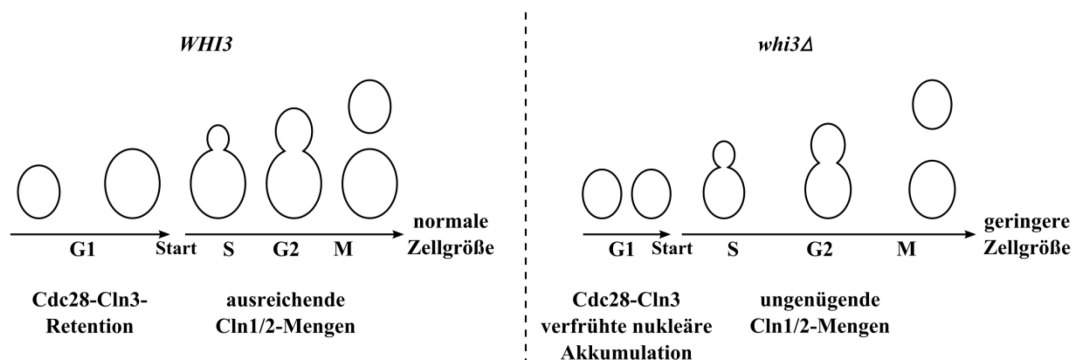


Abb. 39: Modell zur Zellgrößenkontrolle in Abhängigkeit von WHI3.

(Links) Zu Beginn eines neuen Zellzyklus verhindert Whi3 die G1/S-Transition durch cytoplasmatische Retention des Cdc28-Cln3-Komplexes bis eine kritische Zellgröße erreicht ist. Anschließend könnte Whi3 jedoch durch Bereitstellung ausreichender G1-Cyclinmengen (Cln1/2) ein zügiges Fortschreiten des Zellzyklus ermöglichen, um eine optimale Zellgröße zu gewährleisten. **(Rechts)** In Abwesenheit von WHI3 treten die Zellen verfrüht und mit kleinerem Volumen in einen neuen Zellzyklus ein. Da weniger G1-Cycline (Cln1/2) zur Verfügung stehen, könnten die folgenden Phasen etwas langsamer ablaufen und der Mutterzelle somit die Möglichkeit für ein zusätzliches Zellwachstum geben, um die Generierung von zu kleinen Zellen zu verhindern.

Diese Hypothese wird außerdem durch die Beobachtung gestützt, dass WHI3- und whi3Δ-Zellen vergleichbare Verdopplungszeiten aufweisen (Abb. 31) (Jorgensen et al., 2002). Würde Whi3 die G1/S-Transition lediglich über Cdc28-Cln3 regulieren und die Zellen ähnliche Zeit für den Durchlauf eines Zellzyklus benötigen, sollten WHI3-defiziente Zellen über eine kürzere Verdopplungszeit verfügen als WHI3-Zellen, da sie zwar kleiner sind aber einen neuen Zellzyklus schneller initiieren können. Die ähnlichen Verdopplungszeiten könnten folglich dadurch erklärt werden, dass im whi3Δ-Hintergrund der schnellere Eintritt in einen neuen Zellzyklus aufgrund der fehlenden Cdc28-Cln3-Retention durch verminderte

Mengen Cln1 bzw. Cln2 kompensiert werden könnte. Die Beobachtung, dass *whi3Δ*-Mutanten kleinere Zellvolumina aufweisen, deutet ferner darauf hin, dass die verfrühte Passage durch Start gravierendere Auswirkungen auf die Zellgröße hat. Dies könnte eventuell darin begründet liegen, dass ein Großteil des Wachstums der Mutterzelle innerhalb der G1-Phase erfolgt und die M-Phase z. B. hauptsächlich auf das Wachstum der Tochterzelle gerichtet ist (Kron et al., 1994; Rupes, 2002). Ob Whi3 weitere Zellzyklusregulatoren wie z. B. die in der Transkriptanalyse angereicherten G2/M-Regulatoren Fkh1/2 steuert, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Neben der Regulation der Zellgröße könnte Whi3 mit Hilfe der G1-Cycline Cln1 und Cln2 ebenfalls das Knospenwachstum innerhalb der S-Phase fördern. Vorangegangene Studien postulierten, dass Whi3 für die apikale Lokalisation des Cdc28-Cln1/2-Komplexes an der Knospenspitze benötigt wird, um die lokale Aktivierung der kleinen Rho-ähnlichen GTPase Cdc42 und deren Effektoren zu gewährleisten (Colomina et al., 2009). Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Whi3 diesen Prozess ebenfalls durch Bereitstellung ausreichender Proteinmengen der G1-Cycline Cln1 und Cln2 kontrollieren könnte, um eine effiziente Cdc28-Cln1/2-Aktivität zu ermöglichen.

Des Weiteren stellt sich die Frage, auf welche Weise Whi3 selbst im Rahmen der Zellgrößenkontrolle reguliert wird. Eine kürzlich erschienene Studie konnte zeigen, dass die PKA-Untereinheit Tpk1 in der Lage ist Whi3 an Serin 568 und wahrscheinlich weiteren Stellen zu phosphorylieren und somit zu inhibieren (Mizunuma et al., 2013). So führt eine Mutation dieses Serinrestes (S568A), welche die Phosphorylierung an dieser Stelle verhindert, zu einer verlängerten G1-Phase und folglich zu größeren Zellen, während eine Phospho-imitierende Mutation (S568D) gegenteilige Auswirkungen hat und zudem die Assoziation von Whi3 mit der *CLN3*-mRNA verschlechtert. Aufgrund dieser Daten postulieren Mizunuma et al. ein Modell, in dem die Tpk1-vermittelte Phosphorylierung von Whi3 zu einer Aktivitätsminderung des RBPs und folglich zu einer verschlechterten Retention und einer verfrühten nukleären Akkumulation des Cdc28-Cln3-Komplexes führt. Diesem Modell zufolge würde die PKA einen rapideren G1/S-Übergang begünstigen und die Zellgröße negativ beeinflussen. Die PKA wurde bereits in früheren Studien mit der Zellgrößenkontrolle in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit in Verbindung gebracht (Cook and Tyers, 2007; Zaman et al., 2008). Allerdings sind die zugrunde liegenden Regulationsnetzwerke noch weitestgehend unverstanden und die PKA-vermittelten Effekte sehr komplex und z. T. widersprüchlich. So begünstigt die PKA z. B. in nährstoffreichem

Medium wahrscheinlich durch die allgemeine Steigerung der Ribosomenbiogenese und Translationsrate die Ausbildung von großen Zellen trotz verkürzter G1-Phase (Hall et al., 1998; Jorgensen et al., 2004; Cook and Tyers, 2007). Andererseits konnte gezeigt werden, dass erhöhte intrazelluläre cAMP-Mengen die Cln3-Proteinmenge und Cdc28-Cln3-Aktivität fördern, was schließlich zur Ausbildung von kleineren Zellen führen würde (Hall et al., 1998). Aus diesem Grund bedarf es noch genauerer Untersuchungen, um die genauen Bedingungen und Mechanismen der Tpk1-vermittelten Kontrolle von Whi3 zu entschlüsseln und die Umweltbedingungen zu bestimmen, die eine Phosphorylierung von Whi3 begünstigen. Zu diesem Zweck könnten z. B. Phosphorylierungsstudien von Whi3 in verschiedenen Zellzyklusphasen unter Nährstoffbedingungen wie Glukosemangel oder Hitzestress dienen, da sowohl Whi3 als auch Tpk1 in die Weiterleitung dieser Umweltbedingungen involviert zu sein scheinen. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Whi3 im Rahmen einer „Feedback“-Regulation ebenfalls in der Lage ist die PKA-Untereinheit Tpk1 zu beeinflussen. Dabei steigert die Anwesenheit von Whi3 zum einen die Proteinmenge von Tpk1 und führt gleichzeitig zu deren nukleärer Akkumulation. Inwiefern die Aktivität von Tpk1 mit dessen Lokalisation zusammenhängt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Hinweise auf eine solche Korrelationen stammen aus vorangegangene Arbeiten, in denen Tpk1 zusammen mit der regulatorischen PKA-Untereinheit Bcy1 in schnell proliferierenden Zellen im Kern vorliegt und nach der Aktivierung des cAMP-/PKA-Signalweges ins Cytoplasma transloziert, während Bcy1 im Kern verbleibt (Griffioen and Branduardi, 2001). Da Bcy1 die Aktivität von Tpk1 blockiert, könnte die nukleäre Akkumulation von Tpk1 in Anwesenheit von *WHI3* mit einer funktionellen Inhibition einhergehen, die in Abwesenheit von *WHI3* aufgehoben wird (Toda et al., 1987a, 1987b). Diesem Modell zufolge würde Whi3 ausreichende Tpk1-Mengen bereitstellen, jedoch gleichzeitig durch dessen räumliche Kontrolle zu einer funktionellen Inaktivierung der PKA-Untereinheit unter bestimmten Bedingungen führen, die erst durch bisher unbekannte Signale aufgehoben wird. Die inaktiven Tpk1-Mengen könnten demnach als eine Art Rücklage fungieren, die es der Zelle ermöglichen über die PKA schneller auf äußere Umweltsignale zu reagieren und die Zellgröße u. a. durch die Regulation von Whi3 zu modulieren. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten zum einen Kolokalisationsstudien mit Tpk1 und Bcy1 im *WHI3*- und *whi3Δ*-Hintergrund sowie die Bestimmung der Aktivität des cAMP-/PKA-Signalweges durch entsprechende Reportergene oder die Messung des Glykongehalts mit Hilfe einer Jodfärbung dienen. Fraglich ist ferner, ob die regulatorische Untereinheit Bcy1

eventuell selbst posttranskriptionell durch Whi3 reguliert wird oder anderweitigen, posttranskriptionellen Modifikationen unterliegt, welche ihre Funktion beeinflussen und indirekt durch Whi3 kontrolliert werden könnten.

3.2 Kontrolle der Ploidiestabilität durch Whi3

Eine weitere interessante Entdeckung dieser Arbeit ist die Involvierung von Whi3 in die Ploidiestabilität. So führt die Deletion des RBPs in haploiden Zellen zu einer hohen Frequenz von Genomduplikationen. Dabei handelt es sich im *whi3Δ*-Hintergrund tatsächlich um eine erhöhte Tendenz zur Verdopplung des Chromosomensatzes und nicht um einen bloßen Wachstumsvorteil von zufällig generierten diploiden Zellen gegenüber den haploiden Zellen. Obwohl die Zunahme des Ploidiegehaltes normaler Weise durch die strenge Kontrolle des Zellzyklus verhindert wird, sind einige Beispiele polyploider Stämme innerhalb des *Saccharomyces* Genus bekannt. Dabei werden v. a. stressreiche Wachstumsbedingungen als Auslöser von Genomduplikationen diskutiert (Albertin and Marullo, 2012; Chen et al., 2012). Polyploide *Saccharomyces* Stämme kommen z. B. in der Brau- und Backkultur sowie als opportunistisch pathogene Hefe vor (Albertin and Marullo, 2012). Unter natürlichen Umständen ist der Ploidiegehalt von *Saccharomyces cerevisiae* jedoch äußerst stabil, da für die korrekte Verteilung des Genoms auf die Mutter- und Tochterzelle diverse streng kontrollierte Prozesse durchlaufen werden müssen (Enserink and Kolodner, 2010). Dabei unterscheidet man grob die folgenden Schritte (Nasmyth and Haering, 2009). Nach der Genomduplikation werden die Schwesterchromatiden zunächst über sogenannte Kohäsine transient miteinander verbunden, um eine vorzeitige Trennung zu verhindern. Anschließend werden die Spindelpolkörper verdoppelt und über Mikrotubuli mit den Kinetochoren der Schwesterchromatiden verbunden. Dabei stellt der Spindelcheckpoint die Biorientierung der Chromatiden sicher, damit jede Schwesterchromatide mit nur einem Spindelpolkörper verbunden ist. Abschließend werden die Kohäsine gespalten und die beiden Spindelpolkörper mitsamt den Chromatiden symmetrisch auf die Mutter- und Tochterzelle verteilt. Diese Segregation erfolgt aktiv über Mikrotubuli mit Hilfe von spezialisierten Motorproteinkomplexen. Die vollständige Trennung von Mutter- und Tochterzelle wird in der Cytokinese vollzogen. Prinzipiell kann eine Verdopplung des Genomsatzes durch unterschiedlichste Mechanismen und Defekte innerhalb dieser Prozessabfolge hervorgerufen werden. So kann z. B. eine zweite Replikationsrunde zu einem vierfachen Chromosomensatz und folglich diploiden Nachkommen führen. Ferner können Defekte innerhalb der Knospung

oder Cytokinese sowie der Chromosomensegregation auftreten. Eine wegweisende Studie konnte diverse Gene identifizieren, deren Deletion in der Generierung von polyploiden Nachkommen resultiert (Chan and Botstein, 1993). So weisen z. B. Zellen mit Mutationen in den Spindelpolkkörper-Komponenten Cdc31 oder Mps2 mehrfache Chromosomensätze auf, da die Spindelpolkkörperassemblierung bzw. -duplikation in diesen Mutanten gestört ist (Schild et al., 1981; Winey et al., 1991). Weitere Beispiele umfassen die Untereinheiten des INO80-Chromatinumstrukturierungskomplexes Ino80 und Ies6, welche die Chromatinzusammensetzung nahe des Kinetochors und somit die Anheftung der Mikrotubuli regulieren, sowie Regulatoren des Spindelcheckpoints wie die Aurora Kinase Ipl1 und die Serin/Threonin-Kinase Mps1 (Winey et al., 1991; Chan and Botstein, 1993; Chambers et al., 2012). Ferner führen Mutationen in der Dynaktinuntereinheit Nip100 oder dem Ankerprotein Num1 zu einer erhöhten Frequenz von internen Mitosen innerhalb der Mutterzelle, da die Spindelpolkkörper und Chromatiden nicht mehr effizient in die Tochterzelle transportiert werden (Kormanec et al., 1991; Kahana et al., 1998). Folglich entstehen zum einen diploide Mutterzellen und zum anderen anukleäre Tochterzellen.

Bisher sind nur wenige RBPs bekannt, die in die Kontrolle der Ploidiestabilität involviert sind. Ein Beispiel aus der Bäckerhefe stellt das 14-KH-Domänen enthaltene Scp160 dar, dessen Deletion zwar zu lebensfähigen, jedoch aneuploiden Zellen mit variierendem Chromosomensatz führt (Wintersberger et al., 1995; Weber et al., 1997). Aktuellen Modellen zufolge scheint Scp160 jedoch nicht selbst in die Chromosomensegregation involviert zu sein, sondern bisher unbekannte Effektorproteine auf translationeller Basis zu kontrollieren. Es stellte sich die Frage, auf welche Weise das RRM-Domänen Protein Whi3 die Integrität des Genoms garantieren kann. In dieser Arbeit konnten zwei verschiedene Mechanismen identifiziert werden, welche die Genomduplikation in *WHI3*-defizienten Stämmen erklären könnten (Abb. 40). Zum einen zeigen die Transkriptprofile, dass Whi3 die Expression diverser Komponenten und Regulatoren des Kohäsinkomplexes negativ reguliert. Darunter befinden sich sowohl die Kernkomponenten *SMC1*, *SMC3*, *MCD1* und *IRR1*, welche den Kohäsinsring um die Schwesterchromatiden ausbilden als auch *ECO1*, *SCC2* und *PDS5*, welche an der Assemblierung der Kohäsine beteiligt sind (Nasmyth and Haering, 2009). Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Mutation dieser Gene in einer erhöhten Ploidiezunahme aufgrund einer vorzeitigen Schwesterchromatidtrennung resultiert (Barbero, 2011). Analog zu diesen Daten könnte die gesteigerte Expression der Kohäsingene im *whi3Δ*-

Hintergrund zu einer verstärkten Kohäsion und folglich einer verschlechterten Trennung der Schwesterchromatiden führen.

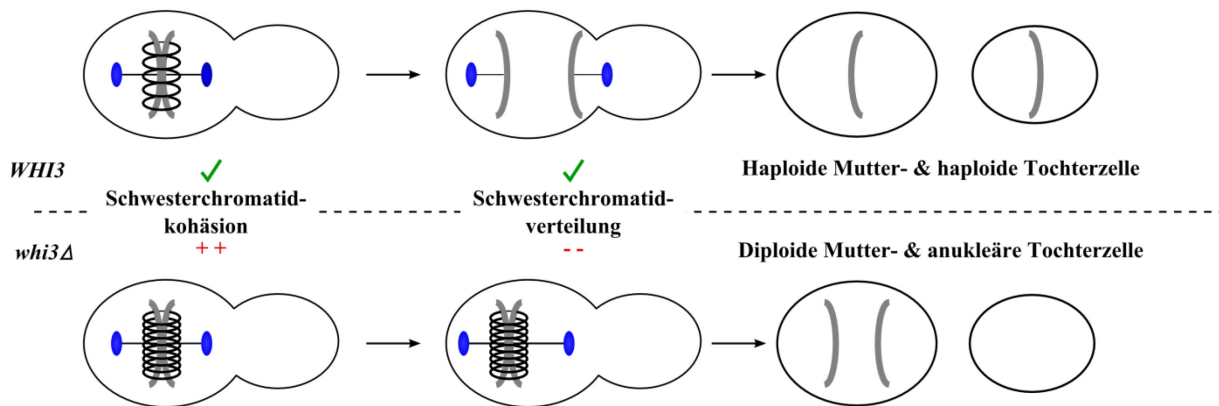


Abb. 40: Modell zur Regulation der Ploidiestabilität durch Whi3.

(Oben) Whi3 könnte die Genomstabilität sowohl durch adäquate Produktion diverser Kohäsionskomponenten als auch durch Bereitstellung ausreichender Proteinmengen der Dynaktinuntereinheit Nip100 regulieren. Auf diese Weise wird die verfrühte oder verspätete Trennung der Schwesterchromatiden verhindert und die korrekte Verteilung des Genoms auf die Mutter- und Tochterzelle ermöglicht. **(Unten)** Die hohe Genomduplikationsrate des *whi3Δ*-Stamms könnte einerseits in einer erhöhten Kohäsion aufgrund der gesteigerten Expressionsmengen der Kohäsingene begründet liegen und ferner auf eine ineffiziente Segregation der Schwesterchromatiden durch zu geringe Nip100-Mengen zurückzuführen sein. Auf diese Weise könnten im Rahmen einer internen Mitose eine diploide Mutter- sowie anukleäre Tochterzelle generiert werden. Die Länge der einzelnen Zellzyklusphasen sowie die Zellgröße sind lediglich schematisch dargestellt und beruhen nicht auf experimentellen Daten.

Ob die Proteinmengen der einzelnen Whi3-regulierten Kohäsingene im *whi3Δ*-Hintergrund ebenfalls wie erwartet steigen, muss jedoch in weiteren Experimenten überprüft werden. Eine Vielzahl der Kohäsingene wird außerdem durch MBF (Mbp1-Swi6) gebunden und reguliert, was darauf hindeutet, dass Whi3 die adäquate Produktion der Kohäsingene beim G1/S-Übergang indirekt durch die Inhibierung des Cdc28-Cln3-Komplexes gewährleisten könnte (Lee et al., 2002; Harbison et al., 2004). Alternativ könnte Whi3 den Transkriptionsfaktorkomplex MBF direkt auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Darüber hinaus scheint Whi3 in der Lage zu sein die Chromosomensegregation und Ploidiestabilität über einen weiteren Weg zu steuern. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Whi3 die Dynaktinuntereinheit Nip100 positiv auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Wie oben bereits erwähnt wurde, weisen *nip100Δ*-Mutanten ebenfalls erhöhte Genomduplikationsfrequenzen auf, da die Spindelpolkörper mit einer gewissen Häufigkeit nicht mehr gerichtet durch den Mutter-Tochterhals dirigiert werden (Kahana et al., 1998). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass Whi3 ausreichende Nip100-Proteinmengen zur Verfügung stellen könnte, um die korrekte Transition des Spindelpolkörpers und der Chromatiden in die Tochterzelle zu gewährleisten. Zusammenfassend könnte demnach die

Abwesenheit von *WHI3* sowohl eine erhöhte Kohäsion der Schwesterchromatiden als auch eine verschlechterte Transition des Spindelpolkörpers in die Tochterzelle hervorrufen, was schließlich in einigen Fällen zur ineffizienten Verteilung des Genoms und somit zu Mutterzellen mit diploidem Genomsatz bzw. Tochterzellen ohne Genom führt (Abb. 40). Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten Tubulin- bzw. DNA-markierte *whi3Δ*-Stämme fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich interner, fehlgeschlagener Mitosen untersucht werden. Ferner stellt sich die Frage, ob die Überexpression der Dynaktinuntereinheit Nip100 die Ploidieinstabilität im *whi3Δ*-Hintergrund supprimieren bzw. reduzieren kann. Neben *Whi3* scheinen jedoch auch die Wachstumsbedingungen einen z. T. unabhängigen Einfluss auf die Genomduplikationsrate auszuüben, da sowohl die Nip100-Proteinkonzentration als auch die Genomduplikationsrate der *whi3Δ*-Mutante stark von den jeweiligen Wachstumsbedingungen abhängen. Dabei spielen sowohl die Nährstoff- als auch die physikalischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Ferner unterliegt *Whi3* selbst einer posttranskriptionellen Regulation in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen. Die *Whi3*-Proteinmenge sinkt zwar beim Wachstum auf festem Vollmedium auf ca. 30%, der Bedingung mit der höchsten hier beobachteten Genomduplikationsrate des *whi3Δ*-Stamms, allerdings scheint diese Menge weiterhin hinreichend für die Gewährleistung der Ploidiestabilität im *WHI3*-Stamm zu sein. Alternativ wären typische RBP-Modifikationen wie z. B. SUMOylierungen, Arginin-Methylierungen oder Phosphorylierungen möglich, welche die Aktivität von *Whi3* trotz niedriger Proteinmengen fördern könnten (Glisovic et al., 2008). Mizunuma et al. konnten in einer kürzlich erschienenen Studie zeigen, dass *Whi3* an Serin 568 und anderen, bisher unbekannten Stellen phosphoryliert werden kann (Mizunuma et al., 2013). Während sich die Tpk1-vermittelte Phosphorylierung an S568 negativ auf viele *Whi3*-regulierte Phänotypen und Prozesse wie die Zellgröße oder Biofilmbildung ausübt, bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um die Auswirkungen dieser Modifikation auf die Ploidiestabilität zu bestimmen. Ferner könnten auch ein oder mehrere der anderen, bisher unbekannten Phosphorylierungen für die Regulation der Ploidiestabilität benötigt werden. Neben Tpk1 sind auch die anderen PKA-Untereinheiten Tpk2 und Tpk3 sowie Ptk2 in der Lage *Whi3 in vitro* zu phosphorylieren. Obwohl bisher keine Studie vorliegt, die eine direkte Beteiligung einer dieser vier Kinasen an der Genomstabilität nachweist, existieren Hinweise, dass die PKA im Menschen an der Chromosomeninstabilität von Tumoren beteiligt sein könnte (Matyakhina et al., 2002). Diese Hypothese bedarf jedoch noch genauerer Untersuchungen. Ferner könnten globale Transkript- und Proteomanalysen unter Bedingungen, die eine hohe bzw. niedrige

Genomduplikationsrate bedingen, einen Einblick in die beteiligten Signalwege und Komponenten gewähren, welche die verschiedenen Nährstoff- und physikalischen Bedingungen wahrnehmen und weiterleiten könnten.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die fehlende Detektion von tetraploiden *WHI3*-defizienten Stämmen. Da weder die Expression der Kohäsingene noch die Nip100-Proteinmenge infolge der Genomduplikation auf normale Level zurückkehren, sollten diploide *whi3Δ/whi3Δ*-Mutanten ähnliche Genomduplikationsfrequenzen aufweisen wie haploide *WHI3*-defiziente Stämme. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnten Ploidie-spezifische regulatorische Mechanismen sein, welche die Ploidiedefekte der *whi3Δ*-Mutante supprimieren. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass tetraploide *whi3Δ/whi3Δ/whi3Δ/whi3Δ*-Stämme tatsächlich entstehen, jedoch über eine geringere Viabilität als diploide *whi3Δ/whi3Δ*-Mutanten verfügen und somit nicht angereichert werden. In Übereinstimmung mit dieser Theorie konnten frühere Studien zeigen, dass Genomduplikationen zu gravierenden Defekten in tetraploiden *S. cerevisiae* Zellen während der stationären Phase führen, da sie nicht in der Lage sind den nötigen G1-Arrest durchzuführen (Andalis et al., 2004). Ferner weisen einige Gene wie z. B. *BIK1* eine Ploidie-spezifische Letalität auf (Storchová et al., 2006). So führt die Deletion des an der Chromosomensegregation beteiligten Proteins erst in der tetraploiden homozygoten Mutante zur Inviabilität, während haploide, diploide oder tetraploide *BIK1*-defiziente Stämme keine Wachstumsdefekte aufweisen. Es könnte sich im Fall von *Whi3* um ein ähnliches Phänomen handeln, v. a. in Anbetracht der Tatsache, dass *Whi3* in die Regulation der Stressantwort involviert ist und seine Abwesenheit zu erhöhten Sensitivitäten gegenüber diversen Stressbedingungen führt. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten Viabilitätsanalysen von konditionalen, tetraploiden *whi3Δ/whi3Δ/whi3Δ/whi3Δ*-Mutanten dienen, die durch Kreuzung generiert wurden. Ferner könnten mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen Mitoseereignisse auf Einzelzellebene studiert und eventuell generierte Tetraploide identifiziert werden, die aufgrund von Wachstumsnachteilen nicht in der Gesamtkultur akkumulieren.

Abschließend bleibt die Frage bestehen, ob die Duplikation des Genomsatzes eine Art Suppressionsmechanismus darstellt, der bestimmte Defekte der haploiden *whi3Δ*-Mutante kompensieren kann. Allerdings konnten weder die verminderte Fähigkeit zur Biofilmbildung noch die Zellgrößendefekte revertiert werden. Dabei haben bereits vorangegangene Studien gezeigt, dass sich eine Ploidieerhöhung tendenziell negativ auf die *FLO11*-Expression und Adhäsion auswirkt, so dass eine Verbesserung der Adhäsionsfähigkeit nicht erwartet wurde

(Galitski et al., 1999). Die beobachtete leichte Zunahme der Zellgröße im diploiden *whi3Δ*-Hintergrund ist lediglich auf die bereits bekannte *Whi3*-unabhängige Ploidie-Regulation des Zellvolumens zurückzuführen (Galitski et al., 1999). Diploide *WHI3/WHI3*- und *whi3Δ/whi3Δ*-Zellen weisen immer noch einen signifikanten Größenunterschied auf. Die Auswirkungen auf die jeweiligen Stressresistenzen des haploiden und diploiden *WHI3*-defizienten Stamms werden in Kapitel 3.4 näher diskutiert. Allerdings scheint die Genomduplikation der Zelle keine gravierenden Vorteile gegenüber den hier getesteten Stressbedingungen zu gewähren. Da *Whi3* viele Regulatoren auf posttranskriptioneller Ebene reguliert, könnte eine globale Proteomanalyse einen größeren Einblick in Komponenten gewähren, die der Zelle nach der Genomduplikation gewisse Vorteile verschaffen könnten. Über die physiologische Relevanz einer solchen Ploidieregulation durch *Whi3* kann nur spekuliert werden. Frühere Studien konnten jedoch zeigen, dass eine Änderung des Ploidiegehaltes v. a. unter Stressbedingungen erfolgen kann und unter diesen Umständen gewisse Vorteile für den Organismus darstellen kann. Ein Beispiel stellt der humanpathogene Pilz *Candida albicans* dar, der z. B. während der Infektion zu einem variierenden Chromosomensatz neigt (Selmecki et al., 2010). Eventuell könnte dieser Mechanismus auch für *S. cerevisiae* unter gewissen Stressbedingungen von Nutzen sein.

3.3 Kontrolle der Biofilmbildung durch *Whi3*

Die vorliegende Arbeit liefert erste Erkenntnisse über das *Whi3*-regulierte Netzwerk zur Biofilmbildung und identifiziert diverse Regulatoren, die in unterschiedlichen Signalwegen involviert sind und positiv durch *Whi3* reguliert werden (Abb. 41). Auf diese Weise ist das RBP *Whi3* maßgeblich an der Expression des Oberflächenflokkuins *FLO11* beteiligt. Zum einen konnte eine mögliche Beteiligung der Chromatinstrukturierer *Ada2* und *Hst3/4* innerhalb der *FLO11*-Regulation festgestellt werden. Während *Ada2* als Teil des ADA- und SAGA-Komplexes durch Histonacetylierung zur Aktivierung einzelner Gene beiträgt, sind die Histondeacetylasen *Hst3/4* hauptsächlich an der transkriptionellen Stilllegung von Genen innerhalb der Telomere beteiligt (Brachmann et al., 1995; Sterner and Berger, 2000). In den hier durchgeführten Transkriptprofilen konnte eine erhöhte Expression der für inhibierende Histondeacetylasen kodierenden *HST3/4* sowie erniedrigte Transkriptmengen des für eine Histonacetylase-Untereinheit kodierenden *ADA2* festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass *Whi3* die *FLO11*-Expression eventuell durch Chromatinmodifikationen mit Hilfe von *Ada2* und *Hst3/4* positiv regulieren könnte.

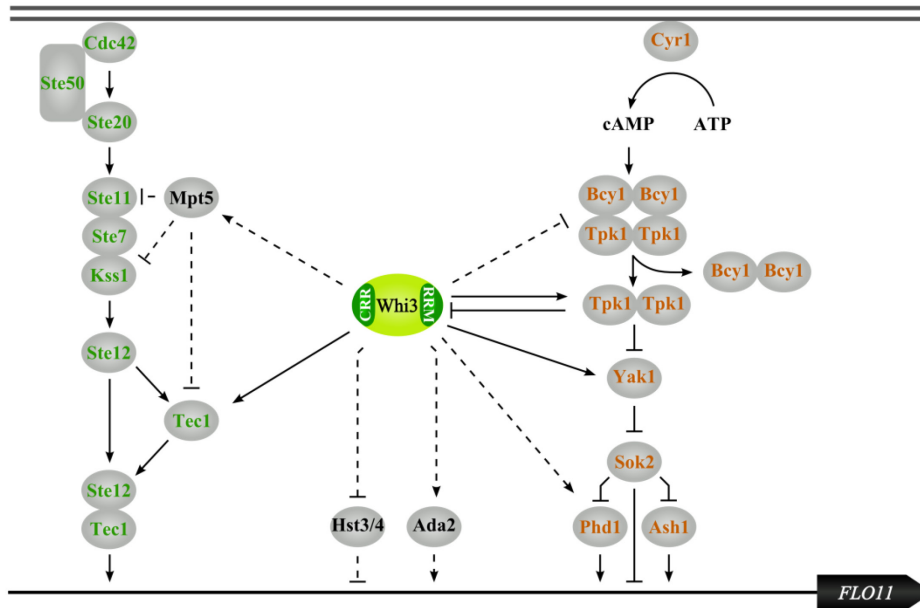


Abb. 41: Schaltschema zur Regulation der *FLO11*-Expression durch Whi3.

Whi3 kontrolliert einige Schlüsselregulatoren des cAMP-/PKA-Signalwegs (orange) und der Kss1-/MAPK-Kaskade (grün) auf posttranskriptioneller Ebene und scheint somit in der Lage zu sein die *FLO11*-Expression effektiv und dynamisch zu regulieren. Die Haupteffektoren von Whi3 im Rahmen der Biofilmbildung umfassen die PKA-Untereinheit Tpk1, die DYRK-Kinase Yak1 und den Transkriptionsfaktor Tec1. Mögliche zusätzliche Effektoren könnten das PUF-RBP Mpt5 und der Transkriptionsfaktor Phd1 darstellen. Ferner ist Whi3 in die Regulation der Tpk1-Lokalisation involviert und kann durch die PKA-Untereinheit phosphoryliert und inhibiert werden. Darüber hinaus könnte Whi3 ebenfalls an Chromatinmodifikationen am *FLO11*-Promotor über die Histondeacetylasen Hst3/4 und die Histonacetylase Ada2 beteiligt sein. Gestrichelte Linien geben mögliche Regulationen an, für Details siehe Text.

Tatsächlich kann die *FLO11*-Expression im *whi3Δ*-Hintergrund durch die zusätzliche Deletion von *HST3/4* bzw. durch Überexpression von *ADA2* im *WHI3*-Stamm geringfügig induziert werden. Somit liefert diese Studie Hinweise, dass neben dem HDAC I und II bzw. dem SWI/SNF-Komplex weitere Chromatinumstrukturierer in die *FLO11*-Regulation involviert sein könnten (Halme et al., 2004; Barrales et al., 2008). Da die Überexpression von *ADA2* in Abwesenheit von *WHI3* jedoch aufgrund einer starken transkriptionellen Regulation durch Whi3 nicht möglich war, müssen weitere Experimente zeigen, ob Ada2 in der Lage ist die niedrigen *FLO11*-Transkriptmengen in der *whi3Δ*- bzw. *whi3Δ hst3Δ hst4Δ*-Mutante zu supprimieren. Eine Analyse der Histonmodifikationen am *FLO11*-Promotor im *WHI3*- und *whi3Δ*-Stamm könnte weiteren Aufschluss über die Beteiligung der Chromatinumstrukturierer Ada2 und Hst3/4 an der Biofilmbildung erteilen.

Darüber hinaus ist das RBP Whi3 in der Lage verschiedene Schlüsselfaktoren der Adhäsion auf posttranskriptioneller Ebene zu kontrollieren. Diese möglichen Whi3-Effektoren umfassen den Transkriptionsfaktor Tec1, der innerhalb der Kss1-/MAPK-Kaskade fungiert, sowie zwei

Faktoren des cAMP-/PKA-Signalweges, die DYRK-Kinase Yak1 und die PKA-Untereinheit Tpk1. Der Transkriptionsaktivator Phd1 und das PUF-RBP Mpt5 könnten weitere, weniger wichtige Effektoren darstellen, die lediglich unter gewissen Bedingungen durch Whi3 reguliert werden. Folglich scheint Whi3 in der Lage zu sein die *FLO11*-Expression über mindestens zwei verschiedene Signalkaskaden durch Bereitstellung ausreichender Proteinmengen bestimmter Schlüsselfaktoren zu steuern.

Der Transkriptionsfaktor Tec1 induziert *FLO11* im Rahmen der Kss1-/MAPK-Kaskade (Rupp et al., 1999; Gavrias and Andrianopoulos, 2006). In manchen Stammhintergründen wird die *TEC1*-mRNA durch ein weiteres RBP, das PUF-Protein Mpt5 kontrolliert, das sich jedoch im Gegensatz zu Whi3 in diesen Stämmen negativ auf die Tec1-Proteinproduktion auswirkt. Sowohl Whi3 als auch Mpt5 sind in der Lage die *TEC1*-mRNA zu binden, allerdings wird der Einfluss von Whi3 über die 5'-UTR weitergeleitet, während Mpt5 Regionen innerhalb der 3'-UTR bindet (Prinz et al., 2007; Colomina et al., 2008). Dies legt den Schluss nahe, dass Whi3 und Mpt5 die Expression von *TEC1* über unabhängige Mechanismen kontrollieren und gemeinsam die adäquate Produktion des Tec1-Proteins gewährleisten könnten. Ferner deuten die hier gewonnenen Daten darauf hin, dass Whi3 das PUF-RBP ebenfalls unter gewissen Bedingungen kontrollieren und somit noch mehr Einfluss auf die *TEC1*-Expression nehmen könnte. Darüber hinaus konnte eine neuere Studie jedoch zeigen, dass Mpt5 im *S. cerevisiae* Stamm $\Sigma 1278b$ in der Lage ist die *FLO11*-Expression zu fördern, indem es transkriptionelle Repressoren von *FLO11* durch Deadenylierung ihrer Transkripte inhibiert (Lo et al., 2012). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Reduktion der Adhäsionsfähigkeit nach der fast vollständigen Deletion des *MPT5*-ORFs beobachtet werden. Es ist somit fraglich, ob Mpt5 in $\Sigma 1278b$ ebenfalls inhibierend auf die Tec1-Produktion wirkt. Folglich könnte Whi3 die *FLO11*-Expression sowohl über Tec1 als auch unabhängig davon über Mpt5 unter bestimmten Bedingungen regulieren. Weitere Studien sind nötig, um den Einfluss von Mpt5 auf die Kss1-/MAPK-Kaskade in $\Sigma 1278b$ näher zu beleuchten und zu prüfen, ob Mpt5 in diesem Stamm ebenfalls in der Lage ist die *STE11*-mRNA und die Kss1-vermittelte Phosphorylierung von Ste11 zu inhibieren (Prinz et al., 2007).

Darüber hinaus kontrolliert Whi3 zwei Komponenten des cAMP-/PKA-Signalweges, Yak1 und Tpk1. Die DYRK-Kinase Yak1 konnte bereits früher als positiver Regulator von *FLO11* isoliert werden, der über eine „Feed-Forward“ Repression über Sok2 und Phd1 die Adhäsion positiv beeinflusst (Malcher et al., 2011). Die hier erbrachten Daten deuten darauf hin, dass

Yak1 einen Teil der Whi3-regulierten zellulären Funktionen vermittelt, insbesondere während der Biofilmbildung und der Stressantwort. So fungiert Yak1 als „Multicopy“-Suppressor einer *whi3Δ*-Mutante bezüglich der Adhäsion und wird ähnlich wie Whi3 für die *FLO11*-Induktion infolge diverser Stressbedingungen wie Hitzestress oder Glukosemangel benötigt. Des Weiteren koregulieren Whi3 und Yak1 eine statistisch signifikante Anzahl von Genen gemeinsam. Folglich scheinen Whi3 und Yak1 innerhalb eines Signalweges zu liegen. Darüber hinaus konnte der Transkriptionsfaktor Phd1 als weiterer möglicher Effektor von Whi3 identifiziert werden, der jedoch unter den getesteten Bedingungen einer nur schwachen Kontrolle durch Whi3 unterlag. Da Phd1 jedoch positiv durch Yak1 reguliert wird, stellt sich die Frage, ob die verringerte Phd1-Menge im *whi3Δ*-Hintergrund tatsächlich auf eine direkte Kontrolle durch Whi3 oder indirekt auf die niedrige Yak1-Proteinmenge in Abwesenheit von *WHI3* zurückzuführen ist (Pan and Heitman, 2000; Malcher et al., 2011). Diese Möglichkeiten müssen in weiteren Experimenten näher untersucht werden. Interessanter Weise scheint Whi3 neben Yak1 ebenfalls die PKA-Untereinheit Tpk1 positiv auf posttranskriptioneller Ebene zu regulieren. Dies erscheint zunächst widersinnig, da Tpk1 die DYRK-Kinase Yak1 durch Phosphorylierung inhibieren kann (Malcher et al., 2011). Allerdings unterliegt Tpk1 einer zusätzlichen räumlichen Regulation durch Whi3. So akkumuliert die PKA-Untereinheit in Abwesenheit von *WHI3* nicht mehr im Kern, sondern ist diffus im Cytoplasma verteilt. Daten aus früheren Arbeiten deuten darauf hin, dass die nukleäre Akkumulation von Tpk1 eventuell mit einer Inaktivierung der PKA-Untereinheit einhergehen könnte, da Tpk1 in schnell proliferierenden Zellen zusammen mit der regulatorischen, inhibierenden PKA-Untereinheit Bcy1 im Kern vorliegt und nach Aktivierung des cAMP-/PKA-Signalweges ins Cytoplasma transloziert, während Bcy1 im Kern verbleibt (Toda et al., 1987a, 1987b; Griffioen and Branduardi, 2001). Mit Hilfe dieser dualen Regulation könnte Whi3 einerseits unter favorisierenden Bedingungen die funktionelle Inaktivierung von Tpk1 durch dessen räumliche Lokalisation bewirken und andererseits ausreichende Tpk1-Proteinmengen bereitstellen, um die rapide und effiziente Reduktion der *FLO11*-Expression durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Whi3 und Yak1 unter Bedingungen zu gewährleisten, welche die Biofilmbildung nicht begünstigen (Abb. 42).

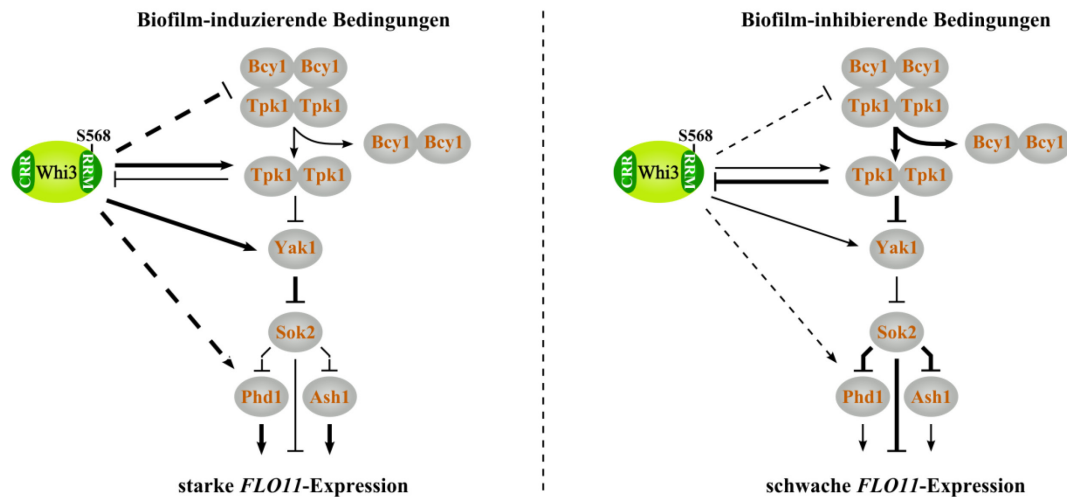


Abb. 42: Model zur dualen Regulation des cAMP-/PKA-Signalweges durch Whi3 unter Biofilm-induzierenden und -inhibierenden Bedingungen.

(Links) Unter Biofilm-induzierenden Bedingungen fördert das RBP Whi3 die Proteinproduktion von Yak1 und möglicher Weise auch von Phd1, um eine adäquate *FLO11*-Expression zu gewährleisten. Gleichzeitig stellt Whi3 als eine Art Rücklage ausreichende Mengen der PKA-Untereinheit Tpk1 zur Verfügung, die jedoch im Kern akkumulieren und durch die mögliche Assoziation mit der nukleären, inhibitorischen PKA-Untereinheit Bcy1 inaktiviert sein könnten. **(Rechts)** Unter Biofilm-inhibierenden Bedingungen könnte ein bisher unbekanntes Signal zur Tpk1-vermittelten Phosphorylierung und Inaktivierung von Whi3 führen, was schließlich in der cytoplasmatischen Relokalisierung und Aktivierung von Tpk1 und der Inhibition der *FLO11*-Expression über Sok2 resultiert. Auf diese Weise ist die Zelle in der Lage die Biofilmbildung über den cAMP-/PKA-Signalweg schnell und effizient an ändernde Umweltbedingungen anzupassen. Gestrichelte Linien zeigen mögliche Regulationen an.

Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten erneut Kolokalisationsstudien mit Tpk1 und Bcy1 sowie die Bestimmung der Aktivität des cAMP-/PKA-Signalweges durch entsprechende Reportergene oder die Messungen des Glykorgehalts mit Hilfe einer Jodfärbung unter *FLO11*-induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen in An- und Abwesenheit von *WHI3* dienen. Des Weiteren könnte die regulatorische Untereinheit Bcy1 selbst posttranskriptionell durch Whi3 reguliert werden oder anderweitigen, posttranskriptionellen Modifikationen unterliegen, welche ihre Funktion beeinflussen und indirekt durch Whi3 kontrolliert werden könnten.

Zusammenfassend scheint Whi3 die *FLO11*-Expression auf vielfältige Weise über mindestens zwei Signaltransduktionskaskaden und möglicherweise ebenfalls über die Chromatinstruktur am *FLO11*-Promotor zu kontrollieren. Auf diese Weise ist das RBP Whi3 in der Lage die Flo11-Produktion effektiv und schnell zu fördern, um eine ausreichende Adhäsionsfähigkeit zu gewährleisten. Ferner könnte Whi3 noch weitere neben den hier getesteten Kandidatengenen kontrollieren, um die Biofilmbildung zu regulieren. Zusätzlichen Aufschluss könnten globale Proteomanalysen von *WHI3*- und *whi3Δ*-Stämmen liefern, da Whi3 vorrangig auf posttranskriptioneller Ebene zu fungieren scheint.

3.4 Regulation der Stressresistenz durch Whi3

Diese Studie liefert neue Einblicke in die Whi3-vermittelte Stressantwort. Vorangegangene Arbeiten konnten zwar zeigen, dass die Deletion von *WHI3* zu stark gesteigerten Sensitivitäten gegenüber diversen Stressbedingungen führt, allerdings sind die zugrunde liegenden Whi3-regulierten Signalnetzwerke bzw. Effektoren nicht bekannt (Sinha et al., 2008; Yoshikawa et al., 2009; Ragni et al., 2011). Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Whi3 die Stressantwort sowohl über die DYRK-Kinase Yak1 als auch über Yak1-unabhängige Mechanismen regulieren könnte. Die Proteinkinase Yak1 wurde bereits früher mit der Stressantwort in Verbindung gebracht und ist in der Lage die drei wichtigsten Stress-induzierten Transkriptionsfaktoren, Msn2/4 und Hsf1, zu phosphorylieren bzw. zu regulieren (Lee et al., 2008). Dabei ermöglicht die Phosphorylierung von Msn2/4 unter Glukose-limitierenden Bedingungen z. B. die nukleäre Akkumulation der beiden Transkriptionsfaktoren (Smith et al., 1998). Im Kern aktivieren Msn2/4 weitere Gene zur Stressbewältigung und induzieren die Yak1-Expression im Rahmen einer „Feed-Back“-Schleife. Sowohl Yak1 als auch Msn2/4 werden durch die PKA inhibiert (Lee et al., 2008; Verghese et al., 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Whi3 und Yak1 sowohl für die generelle *FLO11*-Expression als auch für die Induktion des Oberflächenproteins infolge bestimmter Stressbedingungen wie Glukosemangel oder Hitzestress benötigt werden. Dabei stellt das RBP Whi3 zumindest unter Glukosemangel durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen ausreichende Yak1-Proteinmengen zur Verfügung und gewährleistet somit eine adäquate *FLO11*-Expression. Unerwarteter Weise sinkt jedoch die Whi3-Proteinmenge infolge der Glukoselimitation und des Hitzestress. Dies legt den Schluss nahe, dass Whi3 eventuell posttranskriptionellen Modifikationen unterlegen sein könnte, die eine gesteigerte Aktivität trotz reduzierter Proteinmengen ermöglichen. Whi3 könnte z. B. durch typische RBP-Modifikationen wie SUMOylierungen, Arginin-Methylierungen bzw. Phosphorylierungen reguliert werden (Glisovic et al., 2008). Hinweise auf einen solchen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus erwachsen aus einer kürzlich erschienen Studie, die zeigen konnte, dass Whi3 u. a. durch die PKA-Untereinheit Tpk1 an Serin 568 und eventuell weiteren Stellen phosphoryliert wird und ferner durch andere Kinasen reguliert werden könnte (Mizunuma et al., 2013). Die PKA ist ebenfalls in die Signalweiterleitung von Glukosemangel und Hitzestress involviert und stellt somit einen möglichen Regulator von Whi3 im Rahmen der Stressantwort dar (Estruch, 2000; Santangelo, 2006). Da sich jedoch zumindest die Phosphorylierung an S568 negativ auf viele Whi3-kontrollierte Prozesse und

Phänotypen wie die Biofilmbildung oder die Zellgröße auswirkt, bedarf es noch weiterer Experimente, um die Einflüsse der einzelnen PKA-Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3 auf den Whi3-Phosphorylierungs- und -Aktivitätszustand unter den jeweiligen Stressbedingungen zu untersuchen.

Darüber hinaus zeigen auch die globalen Transkriptprofile, dass sowohl Whi3 als auch Yak1 in die allgemeine Stressantwort involviert sind und diese Funktion wahrscheinlich über Msn2/4 vermitteln könnten. Allerdings scheinen Whi3 und Yak1 auch unabhängig voneinander in der Lage zu sein die Stressantwort zu regulieren. So beinhaltet das nur durch Yak1-regulierte Gencluster diverse Stressgene, die nicht durch Whi3 beeinflusst werden. Darüber hinaus scheint die Abwesenheit von *WHI3* entgegen den Erwartungen ein unbekanntes, zelluläres Stresssignal trotz Abwesenheit von äußeren Stressreizen zu erzeugen. So konnte im *whi3Δ*-Stamm eine Induktion einiger Msn2/4-regulierter Stressgene beobachtet werden, obwohl bisher gezeigt werden konnte, dass Whi3 die Stressantwort positiv reguliert. Diese Gene kodieren u. a. für die Hitzeschockfaktoren Hsp26 und Hsp12, die als Chaperone unter Stressbedingungen die Löslichkeit von Proteinen gewährleisten und u. a. an der Membranintegrität beteiligt sind, sowie für das Multistressprotein Ddr2 (Petko and Lindquist, 1986; Praekelt and Meacock, 1990; Kobayashi et al., 1996; Amorós and Estruch, 2001). Allerdings weisen die *whi3Δ*-Mutanten trotz dieser erhöhten Stressgenexpression verstärkte Sensitivitäten gegenüber diversen Stresssituationen wie z. B. einem Hitzeschock oder dem Zellwandinterkalator „Calcofluor White“ auf. Diese Daten deuten darauf hin, dass Whi3 die Stressantwort eventuell über einen weiteren, Yak1-unabhängigen Faktor wie z. B. einen Repressor regulieren könnte, der unter positiver Kontrolle des RBPs steht. Auf diese Weise wäre eine genauere Feinabstimmung der Stressantwort möglich. Im *whi3Δ*-Hintergrund würden folglich einige Gene der Stressantwort durch die Derepression dieses Inhibitors induziert werden, während jedoch die adäquate Aktivierung zusätzlicher Gene über den Yak1-Zweig aufgrund geringer Yak1-Proteinmengen ausbleibt und die *whi3Δ*-Mutante folglich unter Stressbedingungen eine erhöhte Sensitivität aufweist. Globale Transkriptanalysen der Kontroll-, *whi3Δ* und *yak1Δ*-Stämme unter verschiedenen Stressbedingungen könnten nähere Einblicke in das Regulationsnetzwerke von Whi3 und Yak1 gewähren. Alternativ könnte die Deletion von *WHI3* auch zu generellen Defekten in der Zelle führen und somit indirekt ein transkriptionelles Stresssignal generieren. Solche Defekte könnten eventuell die Zellwand betreffen, da Whi3 bereits in vorangegangenen Arbeiten mit der Zellwandstressantwort in Verbindung gebracht wurde. So führt die Deletion von *WHI3*

allein zwar nicht zur Induktion des Zellwandintegritätssignalweges, allerdings konnte unter Zellwandstress eine Hyperaktivierung dieses Signalweges im *whi3Δ*-Hintergrund beobachtet werden (Ragni et al., 2011). Ferner ist Whi3 in der Lage diverse Transkripte von Zellwandfaktoren zu binden (Colomina et al., 2008). Ob Whi3 tatsächlich die Zellwandintegrität beeinträchtigt muss jedoch in weiteren Untersuchungen bestimmt werden. Eine weitere interessante Beobachtung konnte im Rahmen der Ploidieerhöhung des *whi3Δ*-Stamms erzielt werden. Obwohl die Genomduplikation zur Reversion der erhöhten Stressgenexpression des haploiden *whi3Δ*-Stamms führt, weisen diploide *whi3Δ/whi3Δ*-Mutanten nur eine leicht verbesserte Resistenz gegenüber „Calcofluor White“ auf, während die Sensitivitäten gegenüber einem Hitzeschock oder Hygromycin B entgegen den Erwartungen noch verstärkt werden. Folglich scheint die Ploidieerhöhung zwar das Whi3-generierte interne Stresssignal aufzuheben, allerdings wird Whi3 trotz dessen zur vollen Resistenzausprägung gegenüber diesen Stresssignalen benötigt. Darüber hinaus könnte die konstitutiv erhöhte Expression einiger Stressgene im haploiden *whi3Δ*-Stamm sogar zu einer allgemeinen Resistenzsteigerung beitragen, die im diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm aufgrund normaler Transkriptmengen ausbleibt und somit die erhöhten Sensitivitäten erklären könnte. Ein ähnliches Phänomen wurde im Rahmen der akquirierten bzw. Kreuzresistenzen beschrieben (Verghese et al., 2012). Dabei vermittelt die Exposition gegenüber mildem oder mäßigem Stress sowohl eine höhere Resistenz während eines zweiten, ähnlichen Stresssignals als auch gegenüber einer anderen Stressbedingung. Ein Grund für dieses Phänomen könnte der intrazelluläre Vorrat von Stressfaktoren sein. Auf diese Weise könnte das durch die *WHI3*-Deletion generierte Stresssignal der haploiden *whi3Δ*-Mutante geringfügige Wachstumsvorteile gegenüber dem diploiden *whi3Δ/whi3Δ*-Stamm verschaffen. Auf welche Weise die Abwesenheit von *WHI3* jedoch das interne Stresssignal erzeugt und wie dieses durch die Genomduplikation aufgehoben wird, muss in weiteren Analysen untersucht werden. Ferner stellt sich die Frage, ob der Ploidiegrad in der Lage ist die transkriptionelle Induktion der Stressantwort unter verschiedenen Stressbedingungen zu beeinflussen.

3.5 Molekulare Mechanismen der Whi3-vermittelten post-transkriptionellen Kontrolle

RBPs können durch unterschiedlichste, molekulare Mechanismen zur Regulation ihrer Zieltranskripte beitragen. Dabei können sowohl die Stabilität und Lokalisation der mRNAs als auch die Translationseffizienz und Proteinstabilität kontrolliert werden. Vorangegangene Studien postulieren, dass das RRM-Domänen RBP Whi3 als cytoplasmatischer Retentionsfaktor von Cdc28 und Cln3 fungiert und zu diesem Zweck die Konsensussequenz GCAU innerhalb der *CLN3*-mRNA bindet (Colomina et al., 2008). In dieser Studie konnte eine weitere Funktion von Whi3 beschrieben werden. So ist Whi3 in der Lage das Protein/mRNA-Verhältnis von mindestens fünf Genen (*CLN1*, *TPK1*, *YAK1*, *TEC1* und *NIP100*) positiv zu regulieren und könnte somit entscheidend zur Bereitstellung ausreichender Proteinmengen dieser Faktoren beitragen. Mindestens zwei Mechanismen sind denkbar, um diese Funktion zu erfüllen. Whi3 könnte einerseits die Translationseffizienz dieser Gene durch Rekrutierung von Translationsinitiationsfaktoren oder -elongationsfaktoren fördern oder die Proteinstabilität durch Rekrutierung von Chaperonen beeinflussen, welche eine schnelle und korrekte Faltung des Proteins nach der Translation gewährleisten. Letztere Hypothese wird zwar durch eine Studie unterstützt, in der eine physikalische Interaktion von Whi3 mit den Chaperonen Ssa1/2 nachgewiesen werden konnte, allerdings konnte dieser Mechanismus in dieser Arbeit zumindest für die DYRK-Kinase Yak1 ausgeschlossen werden (Wang et al., 2004). Inwiefern Whi3 die Proteinstabilität der anderen Effektoren beeinflusst, muss in weiteren Analysen untersucht werden. Dahingegen sprechen die hier gewonnenen Daten eher für eine translationelle Funktion von Whi3. Zum einen weisen *WHI3*-defiziente Stämme eine erhöhte Sensitivität gegenüber geringen Dosen diverser Translationsinhibitoren auf, was eine generelle Beeinträchtigung der Translation im *whi3Δ*-Hintergrund vermuten lässt. Ferner interagiert Whi3 laut einer früheren Studie mit der essentiellen Helikase Ded1, die für die Auflösung von inhibierenden Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA während der Translationsinitiation benötigt wird (Marsden et al., 2006). Aus diesen Daten kann ein Modell postuliert werden, in dem Whi3 durch Rekrutierung von Ded1 eine effizientere Translationsinitiation und somit Proteinproduktion gewährleisten könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte zum einen das Vorkommen von Ded1 an Whi3-regulierten mRNAs mit Hilfe von ChIP-Analysen in Abhängigkeit von *WHI3* bestimmt werden. Ferner könnten Polysomanalysen einen generellen Aufschluss über die Translationseffizienz in An- oder Abwesenheit von *WHI3* gewähren.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob Whi3 tatsächlich direkt die hier identifizierten Effektoren reguliert, da in einer Koimmunopräzipitationsanalysen lediglich die *CLN1*- und *TEC1*-mRNA, nicht jedoch die *TPK1*-, *YAK1*- oder *NIP100*-mRNA durch Whi3 gebunden wurden (Garí et al., 2001; Colomina et al., 2008). Eventuell ist die Interaktion zwischen den letzten drei Transkripten und Whi3 zu schwach, um in dieser globalen Analyse identifiziert zu werden. Direkte Koimmunopräzipitationsexperimente, in denen Whi3 z. B. mit den gebundenen Transkripten transient *in vivo* verknüpft wird, könnten weitere Aufschlüsse über die jeweiligen Interaktionen gewähren.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die Whi3-regulierten Bereiche näher einzugrenzen. Im Gegensatz zu dem PUF-Protein Mpt5, das vorrangig Regionen in der 3'-UTR von Zieltranskripten bindet, scheint die Whi3-Kontrolle sowohl über Sequenzen innerhalb der 5'-UTR als auch der ORF-Region weitergeleitet zu werden (Quenault et al., 2011). Zusätzliche putative regulatorische Elemente innerhalb der 3'-UTR wurden aufgrund des Versuchsaufbaus nicht berücksichtigt, so dass sich die hier beobachtete Whi3-Kontrolle auch auf weitere Gene erstrecken bzw. größere Ausmaße als die hier gemessenen annehmen könnte. Im Rahmen der räumlichen Kontrolle der *CLN3*-mRNA konnte bereits eine Konsensussequenz identifiziert werden, die auch in den Whi3-gebundenen Transkripten einer globalen Analyse gehäuft vorkommt (Colomina et al., 2008; Riordan et al., 2011). Diese GCAU-Tetranukleotide scheinen zwar für die Regulation der *CLN3*-mRNA essentiell zu sein, allerdings muss in weiteren Experimenten untersucht werden, ob diese Sequenz ebenfalls hinreichend für die hier beobachtete Kontrolle der Protein/mRNA-Verhältnisse ist, da keine eindeutige Korrelation zwischen der Anzahl der GCAU-Tetranukleotide mit den Whi3-regulierten Regionen festgestellt werden konnte (Tab. 1). Da die Probenmenge jedoch sehr gering ist, ist darüber zum jetzigen Zeitpunkt keine stichhaltige Aussage möglich. In diesem Rahmen könnten erneut globale Proteomanalysen hilfreich sein, um die zellulären Protein/mRNA-Verhältnisse zu bestimmen. Auf diese Weise könnten weitere Ziel-mRNAs von Whi3 identifiziert werden und mit Hilfe von bioinformatischen Analysen mögliche Konsensussequenzen für diesen Regulationsmechanismus aufgedeckt werden. Alternativ könnten einfache Mutationsanalysen der GCAU-Sequenzen innerhalb der *TPK1*-, *YAK1*-, *TEC1*- und *CLN1*-mRNA analog zu Colomina (2008) Aufschlüsse über die Notwendigkeit dieser Sequenzen für die hier beobachtete Whi3-Kontrolle liefern.

3.6 Ausblick

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue Einblicke in das komplexe Regulationsnetzwerk gewährt werden, mit dem das RBP Whi3 diverse zelluläre Prozesse des Zellwachstums und der Entwicklung kontrolliert (Abb. 43).

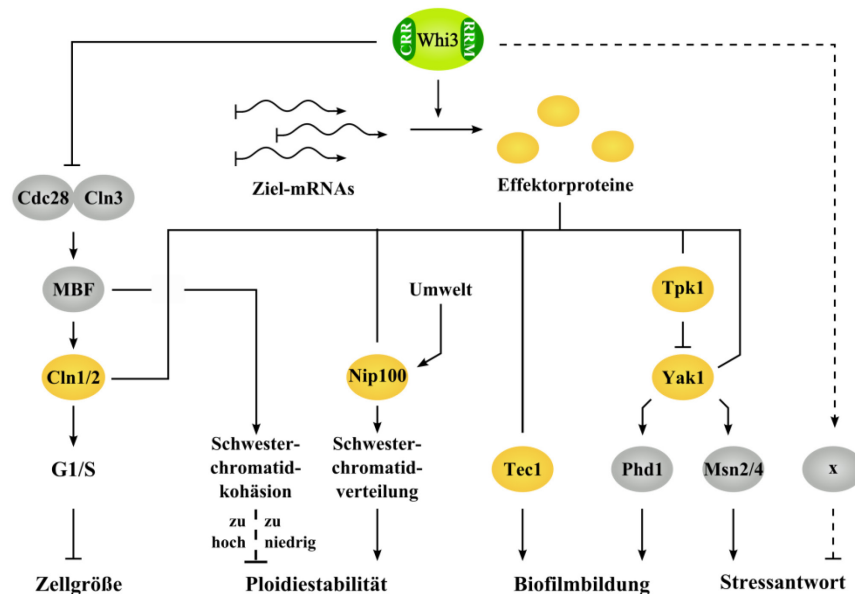


Abb. 43: Model des Whi3-kontrollierten Signalnetzwerkes zur Regulation der Zellgröße, Ploidiestabilität, Biofilmbildung und Stressantwort.

Das RBP Whi3 fördert die Expression diverser Effektoren (gelb) auf posttranskriptioneller Ebene, um das Zellwachstum und die Entwicklung zu steuern. Diese Schlüsselfaktoren umfassen die G1-Zykline Cln1/2 zur Zellzykluskontrolle, die in die Chromosomensegregation involvierte Dynaktinuntereinheit Nip100, sowie die Biofilmregulatoren Tec1, Tpk1 und Yak1. Ferner könnte die allgemeine Stressantwort ebenfalls über Yak1 und einen bisher unbekannten Inhibitor X weitergeleitet werden. Im Rahmen des Zellzyklus reguliert Whi3 ferner den Cdc28-Cln3-Komplex sowie wahrscheinlich indirekt den Transkriptionsfaktorkomplex MBF am G1/S-Übergang.

Darüber hinaus konnte Whi3 erstmals als wichtiger Regulator der Ploidiestabilität identifiziert werden. Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Whi3 diese Funktionen durch Regulation der Translationseffizienz von wichtigen Schlüsselfaktoren dieser Prozesse erfüllen könnte. Da dieser Mechanismus posttranskriptionell erfolgt, könnte Whi3 seine Zielgene somit schnell und effizient steuern und dazu beitragen die adäquate Kapazität von Signalnetzwerken zu gewährleisten.

WHI3-homologe Gene konnten ebenfalls in diversen anderen Pilzen identifiziert werden wie z. B. den humanpathogenen Hefen *Candida glabrata* und *Candida albicans* sowie in den filamentösen Pilzen *Aspergillus nidulans* und *Neurospora crassa*. Bisher wurden jedoch noch

keine funktionellen Analysen dieser Gene durchgeführt, so dass es weiterhin fraglich ist, ob diese Proteine ähnliche Funktionen wie Whi3 übernehmen. Diese Fragestellung ist besonders hinsichtlich der Ploidiestabilität und dessen physiologischer Relevanz interessant, da der wechselnde Chromosomengehalt von *Candida albicans* Isolaten eventuell eine Art Ausweichmanöver gegenüber dem Immunsystem darstellen könnte und somit von hoher medizinischer Relevanz ist (Selmecki et al., 2010).

4 MATERIAL

4.1 Chemikalien, Enzyme, Reagenzien, Kits und Sonstiges

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen CARL ROTH GmbH & Co. KG, SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH und VWR INTERNATIONAL GmbH bezogen. Die Enzyme stammen von FERMENTAS und NEW ENGLAND BIOLABS Inc, die Gebrauchsmaterialien von SARSTEDT AG & Co. und VWR INTERNATIONAL GmbH.

Tab. 2: Verwendete Enzyme, Reagenzien, Kits und Sonstiges.

Bezeichnung	Bezugsquelle
AcTEV™-Protease	INVITROGEN GmbH
„Affimetrix GeneChip® Yeast Genome 2.0 expression Array“	AFFIMETRIX GmbH
„Agilent RNA6000 Nano Kit“	AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH
(α -P ³²)dCTP	HARTMANN ANALYTIC GmbH
„Amersham Hyperfilm™ ECL, RPN1674“	AMERSHAM BIOSCIENCES
„Amersham Megaprime™ DNA Labeling System“	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES
Calmodulin-Matrix	STRATAGENE
„CDP-Star“	NEW ENGLAND BIOLABS Inc.
„Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten ohne EDTA“	ROCHE DEUTSCHLANG HOLDING GmbH
„E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit“	OMEGA BIO-TEK Inc.
„GeneChip® 3'IVT Express Kit“	AFFIMETRIX GmbH
„GeneRuler™ DNA Ladder Mix“	FERMENTAS
„Hybond-N Nylonmembran“	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES
„KOD-HiFi“-Polymerase	NOVAGEN
„MobiSpin S200“-Säule	MOBITEC GmbH
„QIAquick Gel Extraction Kit“	QIAGEN GmbH
„PageRuler™ Prestained Protein Ladder“	FERMENTAS
„PCR DIG Labeling Mix“	ROCHE DEUTSCHLANG HOLDING GmbH
„Phusion-High-Fidelity“-Polymerase	THERMO SCIENTIFIC Inc.
„Plasmid Mini-Kit“	QIAGEN GmbH
Propidiumiodid	APPLICHEM GmbH
Proteinase K	ROCHE DEUTSCHLANG HOLDING GmbH
„Protran® Nitrocellulosemembran“	SCHLEICHER & SCHUELL BIOSCIENCES GmbH
RNAse A	CARL ROTH GmbH

Bezeichnung	Bezugsquelle
„RNeasy® Mini Kit“	QIAGEN GmbH
„Roti®-Nylon Plus“-Membran	CARL ROTH GmbH & Co. KG
„Shrimp Alkaline Phosphatase“	FERMENTAS
„Storage Phosphor Cassette“	AMERSHAM BIOSCIENCES
T4 DNA Ligase	ROCHE DEUTSCHLANG HOLDING GmbH
Whatmanpapier	VWR INTERNATIONAL GmbH

4.1.1 Puffer und Lösungen

Tab. 3: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Alkalischer Lysepuffer	1,85 M NaOH 7,5% (v/v) β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)	Proteinextraktion
Aufschluss-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 20% (v/v) Glycerin 1 mM DTT (frisch zugeben)	Photometrischer β -Galaktosidasetest
CBP-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Nonidet P-40 1 mM Mg-Acetat 1 mM Imidazol 2 mM CaCl_2 10 mM β -Mercaptoethanol (frisch zugeben)	Aufreinigung von Proteinen (CLIP)
„CDP-Star“-Lösung	1 \times DIG3 100 μ l „CDP-Star“	Northern-Analyse (DIG)
„Cross“-RNA-Puffer I	0,3 M NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0 0,2% (w/v) SDS	Northern-Analyse
„Cross“-RNA-Puffer II	1 \times TE 0,2% (w/v) SDS	Northern-Analyse
DIG1	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5 mit NaOH einstellen	Northern- und Southern-Analyse (DIG)
DIG2	1 \times DIG1 1% (w/v) Blockierungsreagenz	Northern- und Southern-Analyse (DIG)
DIG3	100 mM Tris-Base 100 mM NaCl pH 9,5 mit HCl einstellen	Northern- und Southern-Analyse (DIG)
DIG-Wasch	1 \times DIG1 0,3% Tween20	Northern- und Southern-Analyse (DIG)
DNA-Proben-puffer (6 \times)	10 mM Tris-HCl, pH 7,6 0,03% (w/v) Bromphenolblau 0,03% (w/v) Xylencyanolblau 0,15% (w/v) Orange G 60% (v/v) Glycerin 60 mM EDTA, pH 8,0	Agarosegel-elektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
ECL-Lösung I	2,5 mM Luminol 400 µM Paracumarsäure 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	Western-Analyse
ECL-Lösung II	5,4 mM H ₂ O ₂ 100 mM Tris-HCl, pH 8,5	Western-Analyse
Elektrophorese-puffer (10×)	0,25 M Tris-Base 2 M Glycin 1% (w/v) SDS	Western-Analyse
FACS-Puffer	1× PBS 3% (w/v) Kälberserum 0,1% (w/v) Natriumazid	FACS-Analyse
Harnstoffpuffer	5% (w/v) SDS 8 M Harnstoff 200 mM Natriumphosphatpuffer 0,1 mM EDTA, pH 8,0 0,03% (w/v) Bromphenolblau 1,5% (w/v) DTT (frisch zugeben)	Western-Analyse
IPP150-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Nonidet P-40	Aufreinigung von Proteinen (CLIP)
Lämmli-Probenpuffer (3×)	1× „Upper Tris“, pH 6,8 7,5% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0,1% (w/v) Bromphenolblau 1,6 M β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)	Aufreinigung von Proteinen (CLIP)
Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0	Plasmidisolation aus Bakterien
Lösung II	0,2% (v/v) NaOH 1% (w/v) SDS	Plasmidisolation aus Bakterien
Lösung III	5 M Ka-Acetat 11,5% (v/v) Essigsäure	Plasmidisolation aus Bakterien
„Lower Tris“ (4×)	1,5 M Tris-Base 8 mM EDTA, pH 8,0 0,4% (w/v) SDS pH 8,8 mit HCl einstellen	Western-Analyse
Lyse-Lösung	1,85 M NaOH 7,5% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)	Western-Analyse
Methylenblau-Lösung	0,04% (w/v) Methylenblau 0,5 M Na-Acetat pH 5,5 mit HCl einstellen	Northern-Analyse
MOPS-Puffer (10×)	200 mM MOPS 80 mM Na-Acetat 10 mM EDTA, pH 8,0 pH 7,0 mit HCl einstellen	Northern-Analyse
Natriumcitrat-puffer	50 mM Citronensäure-Monocitrat pH 7,4 mit NaOH einstellen	FACS-Analyse
Natriumphosphatpuffer (1 M)	577 mM Na ₂ HPO ₄ 423 mM NaH ₂ PO ₄	Northern-Analyse

Bezeichnung	Zusammensetzung		Verwendung
Northern-Hybridisierungspuffer	50 mM 50 mM 100 mM 1 mM 5% (w/v)	Natriumphosphatpuffer Pipes NaCl EDTA, pH 8,0 SDS pH 7,0 mit NaOH einstellen	Northern-Analyse (radioaktiv)
Northern-Stripping-Puffer	10 mM 0,2% (w/v)	Tris-HCl, pH 7,4 SDS	Northern-Analyse (radioaktiv)
Northern-Waschpuffer	1× 0,1% (w/v)	SSC SDS	Northern-Analyse (radioaktiv)
ONPG-Lösung	13,3 mM	ONPG in Z-Puffer	Photometrischer β -Galaktosidasetest
PBS-Puffer (10×)	137 mM 2,7 mM 4,3 mM 1,4 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O KH ₂ PO ₄	FACS-Analyse
PEG	100 mM 10 mM 1 mM 40% (w/v)	Li-Acetat Tris-HCl, pH 8,0 EDTA, pH 8,0 PEG 3350	Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen
PMSF-Lösung	100 mM	PMSF in Isopropanol	Photometrischer β -Galaktosidasetest
Ponceaulösung	3% (w/v) 0,2% (w/v)	TCA Ponceaureagenz	Western-Analyse
Puffer A	10 mM 10 mM 1,5 mM 0,1% (v/v) 50 mM 0,1 mM 0,5 mM 0,5 mM 2 mM 1 μ m 2 μ m 4 μ m 2,6 μ m 300 μ l	K-Hepes, pH 7,9 KCl MgCl ₂ Nonidet P-40 NaF Na ₃ VO ₄ (vorher 5 min bei 95 °C) DTT (frisch zugeben) PMSF (frisch zugeben) Benzamidin (frisch zugeben) Leupeptin (frisch zugeben) Pepstatin A (frisch zugeben) Chymostatin (frisch zugeben) Aprotinin (frisch zugeben) „Complete Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA“ (frisch zugeben)	Aufreinigung von Proteinen (CLIP)
RF1	100 mM 50 mM 30 mM 10 mM 15% (v/v)	RbCl MnCl ₂ KAc, pH 7,5 CaCl ₂ *2H ₂ O Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure einstellen	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen
RF2	10 mM 10 mM 75 mM 15% (v/v)	RbCl MOPS CaCl ₂ *2H ₂ O Glycerin pH 6,8 mit NaOH einstellen	Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
RNA-Ladepuffer	1× MOPS 50% (v/v) Glycerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau 0,5% (w/v) Xylencyanolblau	Northern-Analyse
S&G-Puffer	2% (v/v) Triton X-100 1% (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0	Isolation genomischer DNA aus Hefezellen
SORB	100 mM Li-Acetat 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0 1 M Sorbitol pH 8,0 mit Essigsäure einstellen	Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen
Southern-Hybpuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer 7% (w/v) SDS pH 7,0 mit NaOH einstellen	Northern-Analyse (DIG)
Southern-Waschpuffer	100 mM Natriumphosphatpuffer 3% (w/v) SDS	Northern-Analyse (DIG)
SSC-Puffer (10×)	1,5 M NaCl 150 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat pH 7,0 mit HCl einstellen	Northern-Analyse
SM-Puffer	200 mM Tris-HCl, pH 8,8 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM KCl 1% (v/v) Triton X-100 0,015 mM BSA 40 mM MgSO ₄	PCR
TAE-Puffer (1×)	40 mM Tris-Acetat 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA, pH 8,0 pH 8,3 mit NaOH einstellen	Agarosegel-elektrophorese
TBS-Puffer (10×)	200 mM Tris-Base 1,37 M NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen	Western-Analyse
TBS-T-Puffer	1× TBS-Puffer 0,1% (v/v) Tween 20	Western-Analyse
TE-Puffer (1×)	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0	DNA/RNA-Isolation
TEV-CB-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Nonidet P-40 0,5 mM EDTA, pH 8,0 1 mM DTT (frisch zugeben)	Aufreinigung von Proteinen (CLIP)
Transferpuffer (10×)	0,25 M Tris-Base 2 M Glycin 0,2% (w/v) SDS	Western-Analyse

Bezeichnung	Zusammensetzung		Verwendung
„Upper Tris“ (4×)	0,5 M 8 mM 0,4% (w/v)	Tris-Base EDTA, pH 8,0 SDS pH 6,8 mit HCl einstellen	Western-Analyse
Usti-Lys-TT- Puffer	100 mM 100 mM 0,1% (v/v) 150 mM 2 mM 50 mM 0,1 mM	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ Nonidet P-40 NaCl EDTA, pH 8,0 NaF Na ₃ VO ₄	Aufreinigung von Proteinen (CLIP)
Z-Puffer	60 mM 40 mM 10 mM 1 mM 0,27% (v/v)	Na ₂ PO ₄ *2H ₂ O NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O KCl MgSO ₄ *7H ₂ O β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)	Photometrischer β-Galaktosidasetest

4.1.2 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien und Stammlösungen zur Kultivierung von *E. coli* und *S. cerevisiae* sind in Tab. 4 aufgelistet. Dabei wurden die entsprechenden Festmedien mit 2% (w/v) Agar versetzt. Aminosäuren wie L-Histidin, L-Leucin, L-Tryptophan und Uracil sowie 5-FOA wurden steril filtriert und erst nach dem Autoklavieren dem entsprechenden Medium zugegeben. LFM-Medium wurde ebenfalls nicht autoklaviert sondern steril filtriert.

Tab. 4: Verwendete Nährmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Aminosäuremischung	2g	jeder Standard-L-Aminosäure außer L-Histidin, L-Leucin, L-Tryptophan und Uracil
LB-Medium („Lysogeny Broth“)	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (w/v)	Trypton Hefeextrakt NaCl
LFM („Low Fluorescence Medium“)	10% (v/v) 0,1% (v/v) 0,1% (v/v) 2% (w/v)	Salzstammlösung Vitaminstammlösung Spurenelementestammlösung Glukose
SC-4-Medium („Synthetic Complete“ ohne L-Histidin, L-Leucin, L- Tryptophan und Uracil)	0,15% (w/v) 0,5% (w/v) 0,2 mM 0,2% (w/v)	„Yeast Nitrogen Base“ (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat) Ammoniumsulfat myo-Inositol Aminosäuremischung
Salzstammlösung	1% (w/v) 0,5% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 5% (w/v)	KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ NaCl CaCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄

Bezeichnung	Zusammensetzung	
SOB-Medium („Super Optimal Broth“)	2% (w/v)	Trypton
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	2,5 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
Spurenelementestammlösung	0,05% (w/v)	H ₃ BO ₄
	0,004% (w/v)	CuSO ₄
	0,01% (w/v)	KI
	0,02% (w/v)	FeCl ₃
	0,04% (w/v)	MnSO ₄
	0,02% (w/v)	Na ₂ MoO ₄
	0,04% (w/v)	ZnSO ₄
Vitaminstammlösung	0,0002% (w/v)	Biotin
	0,04% (w/v)	Calciumpantothenat
	0,2% (w/v)	Inositol
	0,04% (w/v)	Niacin
	0,02% (w/v)	Para-Aminobenzoessäure
	0,04% (w/v)	Pyroxidin-HCl
	0,04% (w/v)	Thiamin-HCl
YEPD-Medium („Yeast Extract, Peptone, Dextrose“)	2% (w/v)	Pepton aus Fleisch
	1% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Glukose
YEPG-Medium („Yeast Extract, Peptone, Galactose“)	2% (w/v)	Pepton aus Fleisch
	1% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Galaktose
YNB-Medium („Yeast Nitrogen Base“)	0,15% (w/v)	„Yeast Nitrogen Base“ (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)
	0,5% (w/v)	Ammoniumsulfat
	0,2 mM	myo-Inositol

4.1.3 Antibiotika und Antimykotika

Die jeweiligen Stammlösungen wurden mit Wasser angesetzt und entsprechende Mengen den auf 60 °C abgekühlten Nährmedien erst nach dem Autoklavieren zugesetzt.

Tab. 5: Verwendete Antibiotika und Antimykotika.

Bezeichnung	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Geneticin (G418)	200 mg/ml	200 µg/ml	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Nourseothricin (clonNat)	200 mg/ml	100 µg/ml	WERNER BIOAGENTS

4.1.4 Antikörper

Die Antikörperlösungen wurden jeweils frisch in 1×TBS-Puffer mit 3% oder 4% (w/v) Magermilchpulver sowie ggf. mit 0,1% (v/v) Tween20 angesetzt und für die Western-Analyse verwendet.

Tab. 6: Verwendete Primärantikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Bezugsquelle
Hase-anti-Calmodulin (polyclonal)	1:2.000	07-482; MERCK MILLIPORE
Maus-anti-GFP (monoklonal)	1:2.500	sc996; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc.
Maus-anti-HA (monoklonal)	1:2.000	H3663; SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH
Maus-anti-myc (monoklonal)	1:5.000	2276; CELL SIGNALING Tech. Inc.
Maus-anti-Tubulin (monoklonal)	1:1.000	cp06; CALBIOCHEM
Schaf-anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment	1:10.000	11096274910; ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GmbH
Ziege-anti-Cdc28 (polyclonal)	1:2.500	sc6709; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc.

Tab. 7: Verwendete Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus-anti-Ziege (polyklonal; Meerrettich-gekoppelt)	1:2.750	sc2354; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc.
Ziege-anti-Hase (polyklonal; Meerrettich-gekoppelt)	1:2.500	sc2054; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc.
Ziege-anti-Maus (polyklonal; Meerrettich-gekoppelt)	1:2.500	115-036-003; DIANOVA GmbH

4.1.5 Geräte und Programme

Tab. 8: Relevante, verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
„Array“-Hybridisierungssofen	AFFIMETRIX GmbH
„Array“-Station „Affimetrix Fluidics 450 Station“	AFFIMETRIX GmbH
„Array“-Scanner „GeneChip® Scanner 3.000“	AFFIMETRIX GmbH
Beleuchtungseinrichtung „RB5000“	KAISER FOTOTECHNIK GmbH & Co. KG
Brutschrank „B5042“	HERAEUS HOLDING GmbH
Chemolumineszenz-Detektions-Gerät „Chemostar Professional Apparatur“	INTAS SCIENCES IMAGING INSTRUMENTS GmbH

Gerät	Hersteller
Digitalkamera „Canon PowerShot A620“	CANON DEUTSCHLAND GmbH
DNA-Geldokumentationsgerät „GelDoc XR Systems“	BIO-RAD LABORATORIES GmbH
DNA-Gelelektrophoreseapparaturen	BIO-RAD LABORATORIES GmbH und Elektronikwerkstatt Philipps-Universität Marburg
Elektroporationsgerät „Gene Pulser TM “	BIO-RAD LABORATORIES GmbH
Entwicklergerät „Medical Film Professor SRX-101A“	KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC IMAGING EUROPE GmbH
FACS-Gerät „BD-FACS Calibur TM Flow Cytometer“	BECTON DICKINSON GmbH
Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager A1“	CARL ZEISS AG
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“	CARL ZEISS AG
Fluoreszenzplattenleser „ImageQuant LAS 4000 Mini“	GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES
Hybridisierungsöfen „HYBRID Mini 38“	SAUER LABORBEDARF
Hybridisierungsöfen „HIR10M“	BOEKEL SCIENTIFIC/GRANT INSTRUMENTS Ltd.
Kugelmühle „MM200“	RETSCH GmbH & Co. KG
Mikrotiterplatten-Lesegerät „Model 680 Microplate Reader“	BIO-RAD LABORATORIES GmbH
Multivortexer „Vibrax Basic“	IKA [®] -WERKE GmbH und Co. KG
„ORCA-ERA CCD-Kamera“	HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GmbH
Partikelanalysegerät „Multisizer TM 3 Coulter Counter [®] “	BECKMAN COULTER GmbH
PCR-Maschine „Primus 25 advanced“	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH
PCR-Maschine „Primus 96 advanced“	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH
Proteingelelektrophoreseapparatur „Mini-PROTEAN [®] 3“	BIO-RAD LABORATORIES GmbH
Proteintransferapparatur „Mini Transfer Electrophoretic Transfer Cell“	BIO-RAD LABORATORIES GmbH
„Rabbit-IgG-Sepharose“-Matrix (A2909)	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH
RNA-Analysegerät „Bioanalyzer 2100“	AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH
Rollinkubator „Stuart [®] SRT6“	KEISON PRODUCTS
Rotationsinkubator	Elektronikwerkstatt Philipps-Universität Marburg
Scanner „Epson Perfection 4990 Photo“	EPSON DEUTSCHLAND GmbH
Schüttelinkubator „Certomat R“	B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL GmbH
Schüttelinkubator „KS15“	EDMUND BÜHLER GmbH
Schüttelinkubator „SM30“	EDMUND BÜHLER GmbH
Spannungsgeber „PowerPac TM Basic Power Supply“	BIO-RAD LABORATORIES GmbH

Gerät	Hersteller
Spektralphotometer „Nano Drop [®] ND Spectrophotometer“	FISHER SCIENTIFIC GmbH
Standkühlzentrifuge „Sigma 4K 15“	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GmbH
Standzentrifuge „Sorvall RC-5B Plus Superspeed“	GMI Inc.
Tischautoklav „LTA 2×3×4“	ZIRBUS TECHNOLOGY GmbH
Tischkühlzentrifuge „Biofuge fresco“	HERAEUS HOLDING GmbH
Tischzentrifuge „Biofuge pico“	HERAEUS HOLDING GmbH
Ultrazentrifuge „Beckman LK7-65 Ultracentrifuge“	BECKMAN COULTER Inc.
Ultraschall-Homogenisator “Sonopuls HD 3100”	BANDELIN ELECTRONIC GmbH & Co. KG
UV-Strahlungsgerät „Stratalinker [®] UV Crosslinker 1800“	STRATAGENE
UV-Transilluminator „IL-200-M“	SAUER LABORBEDARF
Wasserbad „1002“	GFL - GESELLSCHAFT FÜR LABORTECHNIK GmbH
Zellhomogenisator „SLM Aminco French Press“	AMERICAN INSTRUMENT EXCHANGE Inc.

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme wurden von ADOBE SYSTEMS GmbH und MICROSOFT DEUTSCHLAND GmbH sowie den in Tab. 9 aufgelisteten Quellen bezogen.

Tab. 9: Verwendete, relevante Programme.

Programm	Bezugsquelle
„4Peaks“	NUCLEOBYTES Inc.
„Affimetrix GeneChip [®] Operating Software“	AFFIMETRIX GmbH
„BD CellQuest Pro [™] Software“	BECTON DICKINSON GmbH
„FlowJo“	TREE STAR Inc.
„GeneChip [®] Command Console“	AFFIMETRIX GmbH
„ImageJ“	http://rsb.info.nih.gov/ij/ (Schneider et al., 2012)
„LabImage 1D“	KAPELAN BIO-IMAGING GmbH
„Microsoft Excel“	MICROSOFT DEUTSCHLAND GmbH
„Multisizer [™] 3 Software“	BECKMAN COULTER GmbH
„Quantity One 1-D“	BIO-RAD LABORATORIES GmbH
„Velocity 3D Imaging Software“	PERKIN ELMER

4.1.6 Bezugsquellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Produkte und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

ADOBE SYSTEMS GmbH (München, D)	KAISER FOTOTECHNIK GmbH & Co. KG (Buchen, D)
AFFIMETRIX GmbH (München, D)	KAPELAN BIO-IMAGING GmbH (Leipzig, D)
AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH (Böblingen, D)	KEISON PRODUCTS (Chelmsford, UK)
AMERICAN INSTRUMENT EXCHANGE Inc. (Haverhill, MA, USA)	KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC IMAGING EUROPE GmbH (München-Neuperlach, D)
AMERSHAM BIOSCIENCES (GE HEALTHCARE LIFESCIENCES, München, D)	MERCK MILLIPORE (MERCK KGaA, Darmstadt, D)
APPLICHEM GmbH (Darmstadt, D)	MICROBIA Inc. (Lexington, UK)
BANDELIN ELECTRONIC GmbH & Co. KG (Berlin, D)	MERCK KGaA (Darmstadt, D)
B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL GmbH (Melsungen, D)	MICROSOFT DEUTSCHLAND GmbH (Bad Homburg vor der Höhe, D)
BD BIOSCIENCES (BECTON DICKINSON GmbH, Heidelberg, D)	MOBITEC GmbH (Göttingen, D)
BECKMAN COULTER GmbH (Krefeld, D)	NEW ENGLAND BIOLABS Inc. (Ipswich, MA, USA)
BIBBY SCIENTIFIC Limited (Staffordshire, UK)	NOVAGEN (MERCK KGaA, Darmstadt, D)
BIO-RAD LABORATORIES GmbH (München, D)	NUCLEOBYTES Inc. (Aalsmeer, NL)
BOEKEL SCIENTIFIC (Feasterville, PA, USA)	OMEGA BIO-TEK Inc. (Norcross, GA, USA)
CALBIOCHEM (MERCK KGaA, Darmstadt, D)	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH (Erlangen, D)
CANON DEUTSCHLAND GmbH (Krefeld, D)	PERKIN ELMER (Waltham, MA, USA)
CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	QIAGEN GmbH (Hilden, D)
CARL ZEISS AG (Oberkochen, D)	RETSCH GmbH & Co. KG (Haan, D)
DIANOVA GmbH (Hamburg, D)	ROCHE DEUTSCHLAND HOLDING GmbH (Grenzach-Wyhlen, D)
CELL SIGNALING TECHNOLOGY Inc. (Danvers, MA, USA)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc. (Heidelberg, D)
EDMUND BÜHLER GmbH (Hechingen, D)	SARSTEDT AG & Co. (Nürnbrecht, D)
FERMENTAS (THERMO SCIENTIFIC Inc., Waltham, MA, USA)	SAUER LABORBEDARF (Reutigen, D)
FISHER SCIENTIFIC GmbH (Schwerte, D)	SCHLEICHER & SCHUELL BIOSCIENCES GmbH (Dassel, D)
GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES (München, D)	SEQLAB – SEQUENCE LABORATORIES GÖTTINGEN GmbH (Göttingen, D)
GFL - GESELLSCHAFT FÜR LABORTECHNIK GmbH (Burgwedel, D)	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, D)
GMI Inc. (Ramsey, MN, USA)	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GmbH (Osterode am Harz, D)
GRANT INSTRUMENTS Ltd. (Cambridgeshire, UK)	STRATAGENE (AGILENT TECHNOLOGIES DEUTSCHLAND GmbH, Böblingen, D)
HAMAMATSU PHOTONICS DEUTSCHLAND GmbH (Herrsching am Ammersee, D)	THERMO SCIENTIFIC Inc. (Waltham, MA, USA)
HARTMANN ANALYTIC GmbH (Braunschweig, D)	TREE STAR Inc. (Ashland, OR, USA)
HERAEUS HOLDING GmbH (Hanau, D)	VWR INTERNATIONAL GmbH (Darmstadt, D)
IKA®-WERKE GmbH und Co. KG (Staufen, D)	WERNER BIOAGENTS (Jena, D)
INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GmbH (Göttingen, D)	ZIRBUS TECHNOLOGY GmbH (Bad Grund/Harz, D)
INVITROGEN GmbH (Karlsruhe, D)	

4.2 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

4.2.1 Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 10 aufgeführt.

Tab. 10: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
DH5 α TM	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	INVITROGEN GmbH
SURE [®]	<i>e14</i> (<i>McrA</i>) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 gyrA96 thi-1 supE44 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (<i>Kan</i> ^r) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q Δ <i>M15 Tn10</i> (<i>Tet</i> ^r)]	STRATAGENE
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> λ ⁻	INVITROGEN GmbH

Alle in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme entstammen der Σ 1278b Serie und sind in Tab. 11 aufgelistet.

Tab. 11: Verwendete Hefestämme.

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM216	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3</i> Δ :: <i>HISG</i> , <i>leu2</i> Δ :: <i>HISG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM266	<i>MATa</i> , <i>leu2</i> :: <i>HISG</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM468	<i>MATa</i> , <i>ura3</i> Δ 0, <i>trp1</i> Δ 0	MICROBIA Inc.
YHUM492	<i>MATa/α</i> , <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0, <i>trp1</i> Δ 0/ <i>trp1</i> Δ 0, <i>leu2</i> Δ / <i>LEU2</i> , <i>his3</i> Δ / <i>HIS3</i>	MICROBIA Inc.
YHUM924	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>flo11</i> Δ :: <i>kanR</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1105	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1</i> :: <i>hisG</i> , <i>whi3</i> Δ :: <i>HIS3</i>	(Malcher et al., 2011)
YHUM1313	YHUM468 mit <i>yak1</i> Δ :: <i>KANMX4</i>	(Malcher et al., 2011)
YHUM1478	YHUM1105 mit <i>hst3</i> Δ :: <i>loxP-URA3-loxP</i> Mit den Oligonukleotiden KO_HST3_1 und KO_HST3_2, deren 5'-Ende ca. 50 bp lange homologe Regionen zu den flankierenden Bereichen von <i>HST3</i> besitzen, wird aus BHUM969 (pUG72) eine <i>loxP-URA3-loxP</i> -Deletionskassette amplifiziert, welche per homologer Rekombination zur Deletion von <i>HST3</i> führt [analog zu Gueldener (1996)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1627	<p>YHUM468 mit <i>WHI3-yeGFP-KANMX4</i></p> <p>Zur C-terminalen, genomischen Markierung von <i>WHI3</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 wurde die <i>yeGFP-KANMX4</i>-Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden <i>Whi3tag1</i> und <i>Whi3tag2</i> amplifiziert, die einen 5'-Überhang zum Integrationsort besitzen (ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon unter Auslassung des Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der <i>yeGFP-KANMX4</i>-Kassette an das C-terminale Ende von <i>WHI3</i> unter Deletion des ursprünglichen Stop-Codons [analog zu Knop (1999)].</p>	diese Arbeit
YHUM1628	<p>YHUM468 mit <i>WHI3-TAP-KANMX4</i></p> <p>Zur C-terminalen, genomischen Markierung von <i>WHI3</i> mit <i>TAP</i> in YHUM468 wurde die <i>TAP-KANMX4</i>-Kassette aus BHUM2309 (pYM13) mit den Oligonukleotiden <i>Whi3tag1</i> und <i>Whi3tag2</i> amplifiziert, die einen 5'-Überhang zum Integrationsort besitzen (ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon unter Auslassung des Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der <i>TAP-KANMX4</i>-Kassette an das C-terminale Ende von <i>WHI3</i> unter Deletion des ursprünglichen Stop-Codons [analog zu Knop (1999)].</p>	diese Arbeit
YHUM1629	<p>YHUM468 mit <i>WHI3-6HA-KANMX4</i></p> <p>Zur C-terminalen, genomischen Markierung von <i>WHI3</i> mit <i>6HA</i> in YHUM468 wurde die <i>6HA-KANMX4</i>-Kassette aus BHUM2037 (pYM14) mit den Oligonukleotiden <i>Whi3tag1</i> und <i>Whi3tag2</i> amplifiziert, die einen 5'-Überhang zum Integrationsort besitzen (ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon unter Auslassung des Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der <i>6HA-KANMX4</i>-Kassette an das C-terminale Ende von <i>WHI3</i> unter Deletion des ursprünglichen Stop-Codons [analog zu Knop (1999)].</p>	diese Arbeit
YHUM1658	<p><i>YHUM1105 mit hst3Δ::loxP, hst4Δ::loxP</i></p> <p>In Stamm YHUM1478 wurde durch Expression der Cre-Rekombinase von BHUM973 (pSH63) der <i>URA3</i>-Marker entfernt (Selektion auf 5-FOA-haltigen Platten) und anschließend analog zu Gueldener (1996) der <i>HST4</i>-ORF deletiert. Dazu wurde aus BHUM969 (pUG72) eine <i>loxP-URA3-loxP</i> Deletionskassette mit den Oligonukleotiden <i>KO_hst4_1</i> und <i>KO_hst4_2</i> amplifiziert, deren 5'-Überhang ca. 50 bp lange homologe Regionen zu den flankierenden Bereichen von <i>HST4</i> aufweist. Per homologer Rekombination wurde der <i>HST4</i>-ORF durch diese Kassette ersetzt. Die anschließende, erneute Expression der Cre-Rekombinase von BHUM973 (pSH63) führte zur Entfernung des <i>URA3</i>-ORFs (Selektion auf 5-FOA-haltigen Platten).</p>	diese Arbeit
YHUM1745	<p>YHUM468 mit <i>TEC1-yeGFP::KANMX4</i></p> <p>Die C-terminale, genomische Markierung von <i>TEC1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i>-Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden <i>Tec1-S3</i> und <i>Tec1-S2</i>, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>TEC1</i>-ORF [analog zu Knop (1999)].</p>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1746	YHUM1920 mit <i>TEC1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>TEC1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tec1-S3 und Tec1-S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>TEC1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1747	YHUM468 mit <i>TEC1¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>TEC1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tec1tag2 und Tec1-S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>TEC1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1748	YHUM1920 mit <i>TEC1¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>TEC1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tec1tag2 und Tec1-S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>TEC1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1755	YHUM468 mit <i>YAK1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>YAK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Yak1tag1 und Yak1tag2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>YAK1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1757	YHUM1920 mit <i>YAK1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>YAK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Yak1tag1 und Yak1tag2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>YAK1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1760	YHUM468 mit <i>YAK1¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>YAK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Yak1tag3 und Yak1tag2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>YAK1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1762	YHUM1920 mit <i>YAK1¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>YAK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Yak1tag3 und Yak1tag2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>YAK1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1884	YHUM468 mit <i>MIG2-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>MIG2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mig2tag1 und Mig2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>MIG2</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1885	YHUM468 mit <i>MPT5-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>MPT5</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mpt5tag1 und Mpt5tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>MPT5</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1886	YHUM468 mit <i>FLO8-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>FLO8</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Flo8tag1 und Flo8tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>FLO8</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1888	YHUM468 mit <i>CLN1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>CLN1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln1tag1 und Cln1tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>CLN1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1920	YHUM468 mit <i>whi3Δ::loxP</i> Mit den Oligonukleotiden Whi3_Kofw und Whi3_Korev, deren 5'-Ende ca. 50bp lange homologe Regionen zu den flankierenden Bereichen des <i>WHI3</i> -ORFs besitzen, wurde aus BHUM969 (pUG72) eine Deletionskassette amplifiziert, welche per homologer Rekombination zur Deletion von <i>WHI3</i> führt [analog zu Gueldener (2004)]. Das <i>URA3</i> -Gen aus <i>Kluyveromyces lactis</i> wurde anschließend durch Exprimierung der Cre-Rekombinase von Plasmid BHUM973 entfernt, so dass eine einzelne <i>loxP</i> -Sequenz im Genom verbleibt (Selektion auf 5-FOA-haltigen Platten).	diese Arbeit
YHUM1921	YHUM468 mit <i>CLN2-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>CLN2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln2tag1 und Cln2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>CLN2</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1922	YHUM468 mit <i>CLN2¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>CLN2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln2tag2 und Cln2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>CLN2</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1923	YHUM1920 mit <i>CLN2-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>CLN2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln2tag1 und Cln2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>CLN2</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1924	YHUM1920 mit <i>CLN2</i> ^{I-99} - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>CLN2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln2tag2 und Cln2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>CLN2</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1925	YHUM468 mit <i>CLN1</i> ^{I-99} - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>CLN1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln1tag2 und Cln1tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>CLN1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1926	YHUM1920 mit <i>CLN1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>CLN1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln1tag1 und Cln1tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>CLN1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1927	YHUM1920 mit <i>CLN1</i> ^{I-99} - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>CLN1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Cln1tag2 und Cln1tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>CLN1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1928	YHUM468 mit <i>MIG2</i> ^{I-99} - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>MIG2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mig2tag2 und Mig2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>MIG2</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1929	YHUM1920 mit <i>MIG2-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>MIG2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mig2tag1 und Mig2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>MIG2</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1930	YHUM1920 mit <i>MIG2¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>MIG2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mig2tag2 und Mig2tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>MIG2</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1931	YHUM468 mit <i>MPT5¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>MPT5</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mpt5tag2 und Mpt5tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>MPT5</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1932	YHUM1920 mit <i>MPT5-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>MPT5</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mpt5tag1 und Mpt5tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>MPT5</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1933	YHUM1920 mit <i>MPT5¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>MPT5</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Mpt5tag2 und Mpt5tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>MPT5</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1934	YHUM468 mit <i>FLO8¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>FLO8</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Flo8tag2 und Flo8tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>FLO8</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1935	YHUM1920 mit <i>FLO8-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>FLO8</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Flo8tag1 und Flo8tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>FLO8</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1936	YHUM1920 mit <i>FLO8¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>FLO8</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Flo8tag2 und Flo8tag3, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>FLO8</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1937	YHUM468 mit <i>TPK2-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>TPK2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk2gTagfw und Tpk2gTagrv, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>TPK2</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1938	YHUM468 mit <i>TPK2¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>TPK2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk2tag2 und Tpk2gTagrv, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>TPK2</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM1939	YHUM1920 mit <i>TPK2-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>TPK2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk2gTagfw und Tpk2gTagrv, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>TPK2</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1940	YHUM1920 mit <i>TPK2¹⁻⁹⁹-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>TPK2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk2tag2 und Tpk2gTagrv, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>TPK2</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM1946 (yCR1)	YHUM216 mit <i>ura3::P_{GALI}-pI4-TEV-KANMX4::ura3</i> In YHUM216 wurde am <i>URA3</i> -Lokus das integrative Plasmid pCT271 mit der TEV-Protease unter Kontrolle des <i>GALI</i> -Promotors eingebracht.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1987	<i>MATa, ura3-52, his3::hisG, STE12-RFP::KanMX4</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM2005	YHUM216 mit <i>ura3::P_{GALI}-pI4-TEV-hphNAT1::ura3</i> Um den <i>KANMX4</i> -Marker in YHUM1946 durch eine <i>hphNAT1</i> -Resistenz zu ersetzen, wurde das <i>hphNAT1</i> -Gen aus pRS306h mit BamHI und PvuII herausgeschnitten und per Gelextraktion isoliert. Nach Transformation in YHUM1946 erfolgte der Ersatz der <i>KANMX4</i> -Resistenz durch <i>natNT1</i> per homologer Rekombination. Die Selektion von positiven Klonen erfolgte mit Nourseothricin.	diese Arbeit
YHUM2041	YHUM468 mit <i>PHD1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>PHD1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Phd1_S3 und Phd1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>PHD1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2042	YHUM1920 mit <i>PHD1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>PHD1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Phd1_S3 und Phd1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>PHD1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2043	YHUM468 mit <i>PHDI</i> ¹⁻⁹⁹ - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>PHDI</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Phd1_S3b und Phd1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>PHDI</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2044	YHUM1920 mit <i>PHDI</i> ¹⁻⁹⁹ - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>PHDI</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Phd1_S3b und Phd1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>PHDI</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2045	YHUM468 mit <i>TPK1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>TPK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk1_S3 und Tpk1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>TPK1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2046	YHUM1920 mit <i>TPK1-yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>TPK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk1_S3 und Tpk1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>TPK1</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2047	YHUM468 mit <i>TPK1</i> ¹⁻⁹⁹ - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>TPK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk1_S3b und Tpk1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>TPK1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2048	YHUM1920 mit <i>TPK1</i> ¹⁻⁹⁹ - <i>yeGFP::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung der ersten 99 bp von <i>TPK1</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden Tpk1_S3b und Tpk1_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 49 bis 99 des ORFs und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter die ersten 99 bp des <i>TPK1</i> -ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2150	<i>MATa/a, ura3Δ0/ura3Δ0, trp1Δ0/trp1Δ0, whi3Δ::loxP/whi3Δ::loxP, MIG2</i> ¹⁻⁹⁹ - <i>yeGFP::KANMX4/MIG2</i> ¹⁻⁹⁹ - <i>yeGFP::KANMX4</i> Diploider <i>whi3Δ</i> -Stamm, der während der genomischen Markierung von <i>MIG2</i> analog zu Stamm YHUM1930 durch spontane Diploidisierung entstanden ist.	diese Arbeit
YHUM2151	<i>MATa/a ura3Δ0/ura3Δ0, trp1Δ0/trp1Δ0, whi3Δ::loxP/whi3Δ::loxP, MIG2-yeGFP::KANMX4/MIG2-yeGFP::KANMX4</i> Diploider <i>whi3Δ</i> -Stamm, der während der genomischen Markierung von <i>MIG2</i> analog zu Stamm YHUM1929 durch spontane Diploidisierung entstanden ist.	diese Arbeit
YHUM2152	<i>MATa/a, ura3Δ0/ura3Δ0, trp1Δ0/trp1Δ0, whi3Δ::loxP/whi3Δ::loxP</i> Diploider <i>whi3Δ</i> -Stamm, der durch mehrmaliges Überstreichen des haploiden <i>whi3Δ</i> -Stamms YHUM1920 auf YEPD-Platten entstanden ist.	diese Arbeit
YHUM2213	YHUM468 mit <i>NIP100-6HA::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>NIP100</i> mit <i>6HA</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>6HA-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM2037 (pYM14) mit den Oligonukleotiden Nip100_S3 und Nip100_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>NIP100</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2214	YHUM1920 mit <i>NIP100-6HA::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>NIP100</i> mit <i>6HA</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>6HA-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM2037 (pYM14) mit den Oligonukleotiden Nip100_S3 und Nip100_S2, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Wegfall des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>NIP100</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit
YHUM2215	<i>MATa/a ura3Δ0/ura3Δ0, trp1Δ0/trp1Δ0, whi3Δ::loxP/whi3Δ::loxP, NIP100-6HA::KANMX4/NIP100-6HA::KANMX4</i> Diploider Stamm, der durch mehrmaliges Überstreichen des haploiden Stamms YHUM2214 auf YEPD-Platten entstanden ist.	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2218	<p>YHUM216 mit <i>loxP-GFP*-TDegF-3HA-WHI3</i></p> <p>Mit den Oligonukleotiden <i>Whi3_S1</i> und <i>Whi3_S4</i>, deren 5'-Überhänge homolog zu 50 bp vor bzw. nach dem ATG des <i>WHI3</i>-ORFs sind (<i>S1</i> inkl. ATG), wurde die <i>loxP-URA3-loxP-GFP*-TDegF-3HA</i>-Kassette aus BHUM1880 amplifiziert und per homologer Rekombination in YHUM216 vor den <i>WHI3</i>-ORF integriert. Anschließend wurde dieser Stamm mit BHUM973 transformiert und in Anwesenheit von Galaktose die Cre-Rekombinase exprimiert, so dass der <i>URA3</i>-Marker wieder aus dem Genom entfernt wurde (Selektion auf 5-FOA-Platten) und <i>WHI3</i> vom nativen Promotor aus exprimiert werden kann. In Anwesenheit von Galaktose wird außerdem die TEV-Protease induziert, was zum proteasomalen Abbau von <i>Whi3</i> führen soll.</p>	diese Arbeit
YHUM2219	<p>YHUM2005 mit <i>WHI3-tagRFP-cODC-TDegF::KANMX4</i></p> <p>Mit Hilfe der Oligonukleotide <i>Whi3tag_1</i> und <i>Whi3tag_2</i>, die homologe Bereiche zu ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon des <i>WHI3</i>-ORFs aufweisen (ohne Stop-Codon) wurde eine <i>tagRFP-cODC-TDegF-KANMX4</i>-Kassette aus pCT330 (Jungbluth et al., 2010) generiert und in YHUM2005 transformiert. Per homologer Rekombination erfolgte die Markierung von <i>WHI3</i> mit dieser Kassette. Kontrollstamm, der keine TEV-Protease besitzt.</p>	diese Arbeit
YHUM2220	<p>YHUM216 mit <i>WHI3-tagRFP-cODC-TDegF::KANMX4</i></p> <p>Mit Hilfe der Oligonukleotide <i>Whi3tag_1</i> und <i>Whi3tag_2</i>, die homologe Bereiche zu ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon des <i>WHI3</i>-ORFs aufweisen (ohne Stop-Codon) wurde eine <i>tagRFP-cODC-TDegF::KANMX4</i>-Kassette aus pCT330 (Jungbluth et al., 2010) generiert und in YHUM216 transformiert. Per homologer Rekombination erfolgte die Markierung von <i>WHI3</i> mit dieser Kassette. In Anwesenheit von Galaktose wird außerdem die TEV-Protease induziert, was zum proteasomalen Abbau von <i>Whi3</i> führen soll.</p>	diese Arbeit
YHUM2221	<p>YHUM468 mit <i>P_{MIG2}-yeGFP::KANMX4</i></p> <p>Die C-terminale, genomische Markierung des ATGs von <i>MIG2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i>-Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden <i>Mig2_S3c</i> und <i>Mig2tag3</i>, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 47 vor dem <i>MIG2</i>-ORF inklusive ATG und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter das ATG des <i>MIG2</i>-ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].</p>	diese Arbeit
YHUM2222	<p>YHUM1920 mit <i>P_{MIG2}-yeGFP::KANMX4</i></p> <p>Die C-terminale, genomische Markierung des ATGs von <i>MIG2</i> mit <i>yeGFP</i> in YHUM1920 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>yeGFP-KANMX4</i>-Kassette aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden <i>Mig2_S3c</i> und <i>Mig2tag3</i>, die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (Basenpaare 47 vor dem <i>MIG2</i>-ORF inklusive ATG und ca. 50 bp nach dem Stop-Codon). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter das ATG des <i>MIG2</i>-ORFs unter Wegfall des restlichen ORFs [analog zu Knop (1999)].</p>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
YHUM2223	YHUM468 mit <i>WHI3-9myc::KANMX4</i> Die C-terminale, genomische Markierung von <i>WHI3</i> mit <i>9myc</i> in YHUM468 erfolgte durch Amplifizierung einer <i>9myc-KANMX4</i> -Kassette aus BHUM2311 (pYM18) mit den Oligonukleotiden <i>Whi3tag1</i> und <i>Whi3tag2</i> , die jeweils 5'-Überhänge zu flankierenden Regionen des Integrationsortes aufweisen (ca. 50 bp vor und nach dem Stop-Codon unter Deletion des ursprünglichen Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der Markierungskassette hinter den <i>WHI3</i> -ORF [analog zu Knop (1999)].	diese Arbeit

4.2.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 12 aufgelistet. Bei Angaben weiterer Stammnamen neben der systematischen Benennung „BHUM“ oder „B“ beziehen sich diese auf die aufgeführte Referenz.

Tab. 12: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
B1820 (pRS316)	<i>URA3, Amp^r, CEN</i>	pRS316	(Sikorski and Hieter, 1989)
B2338 (pRS202)	<i>URA3, Amp^r, 2μ</i>	pRS202	(Connelly and Hieter, 1996)
B2445 (YCplac33)	<i>URA3, Amp^r, CEN</i>	YCplac33	(Gietz and Sugino, 1988)
B2798 (pRS414)	<i>TRP1, Amp^r, CEN</i>	pRS414	(Sikorski and Hieter, 1989)
B3782 (YEpl355)	<i>P_{FLO11}-LACZ, URA3, Amp^r, 2μ</i>	YEpl355	(Rupp et al., 1999)
BHUM930 (pGREG600)	<i>P_{GALI}-rec1-HIS3-rec2-GFP-T_{CYC1}, URA3, Amp^r, CEN</i>		(Jansen et al., 2005)
BHUM969 (pUG72)	<i>loxP-URA3^{K. lactis}-loxP, Amp^r</i> Mit Oligonukleotiden, deren 5'-Ende ca 50bp lange homologe Regionen zu den flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens besitzen, wurde aus pUG72 eine Deletionskassette amplifiziert, welche per homologer Rekombination zur Deletion des gewünschten ORFs führte. Das <i>URA3</i> -Gen aus <i>Kluyveromyces lactis</i> kann durch Expressierung der Cre-Rekombinase von Plasmid BHUM973 wieder entfernt werden, so dass eine einzelne <i>loxP</i> -Sequenz im Genom verbleibt (Selektion auf 5-FOA-haltigen Platten).		(Gueldener et al., 2002)
BHUM973 (pSH63)	<i>P_{GALI}-CRE-T_{CYC1}, TRP1, Amp^r, CEN</i> Die Cre-Rekombinase wurde zur Entfernung des <i>URA3</i> -Markers nach einer Gendeletion mit dem <i>loxP</i> -Set verwendet, so dass eine einzelne <i>loxP</i> -Sequenz im Genom verbleibt (Selektion auf 5-FOA-haltigen Platten).		(Gueldener et al., 2002)

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
BHUM1058	<i>P_{YAKI}-YAKI-T_{YAKI}, URA3, Amp^r, 2μ</i>	pRS202	(Malcher et al., 2011)
BHUM1117 (pDM76)	<i>P_{YAKI}-YAKI-3HA-T_{YAKI}, URA3, Amp^r, CEN</i>	pHAC33	(Martin et al., 2004)
BHUM1119 (pHIS063)	<i>P_{YAKI}-GFP-YAKI-T_{YAKI}, HIS3, Amp^r, CEN</i>	pRS316	(Moriya and Shimizu-Yoshida, 2001)
BHUM1184 (pYM12)	<i>yeGFP-KANMX4, Amp^r</i> Zur C-terminalen, genomischen Markierung von Genen wurde die <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette mit Hilfe von Oligonukleotiden amplifiziert, die einen 5'-Überhang zum Integrationsort besitzen (ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon unter Auslassung des Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der <i>yeGFP-KANMX4</i> -Kassette an das C-terminale Ende des ORFs unter Deletion des ursprünglichen Stop-Codons.		(Knop et al., 1999)
BHUM1186	<i>ACT1, Amp^r</i> Vektor zur Herstellung der <i>ACT1</i> -DNA-Sonde mit den Oligonukleotiden ACT1_MM1 und ACT1_MM2.	pCRII Blunt-Topo	Stammsammlung AG Mösch
BHUM1424	<i>DON1^{U. maydis}, Amp^r</i> Suizidgen <i>eco47IR</i> wurde durch Insertion von <i>DON1</i> aus <i>Ustilago maydis</i> als Platzhalter unterbrochen und somit inaktiviert.	pJET1.2	Stammsammlung AG Mösch
BHUM1459	<i>P_{PGK1}-ADA2-GFP</i> in pGREG600 Zunächst wurde der <i>ADA2</i> -ORF mit den Oligonukleotiden DDAda2_1 und DDAda2_2 per „Drag & Drop“ Klonierung in pGREG600 integriert (Jansen et al., 2005). Danach wurde der <i>GALI</i> -Promotor per homologer Rekombination in Hefe durch den <i>PGK1</i> -Promotor (-952 bis ATG) ersetzt, der mit den Oligonukleotiden PGK1_for und PGK1_rev in einer PCR amplifiziert worden war.	pGREG600	diese Arbeit
BHUM1574	<i>P_{PGK1}-FLO11-T_{FLO11}, URA3, Amp^r, CEN</i>	YCplac33	(Malcher et al., 2011)
BHUM1880	<i>loxP-URA3-loxP-GFP*-TDegF-3HA, Amp^r</i> Mit S1- und S4-Oligonukleotiden der pYM-Serie wurde die <i>loxP-URA3-loxP-GFP*-TDegF-3HA</i> -Kassette amplifiziert und zur N-terminalen Markierung von Genen analog zu Knop (1999) verwendet. Nach der Entfernung des <i>URA3</i> -Markers infolge der Expression der Cre-Rekombinase von BHUM973 wurde das entsprechende Gen von seinem nativen Promotor exprimiert. Die konditional exprimierte TEV-Protease schneidet innerhalb der TDegF-Sequenz und führt somit zum proteasomalen Abbau des markierten Proteins [TIPI-System s.a. Taxis et al. (2009)]. Das GFP ist auf Grund eines Austauschs des Tyrosins an Position 66 gegen Glycin nicht funktionell, sondern dient lediglich der Detektion innerhalb einer Western-Analyse.		Stammsammlung AG Mösch

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
BHUM2037 (pYM14)	<i>6HA-KANMX4, Amp^r</i> Zur C-terminalen, genomischen Markierung von Genen wurde die <i>6HA-KANMX4</i> -Kassette mit Hilfe von Oligonukleotiden amplifiziert, die einen 5'-Überhang zum Integrationsort besitzen (ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon unter Auslassung des Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der <i>6HA-KANMX4</i> -Kassette an das C-terminale Ende des ORFs unter Deletion des ursprünglichen Stop-Codons.		(Janke et al., 2004)
BHUM2027	<i>P_{TDH3}-RFP, LEU2, Amp^r, CEN</i>	pRS415	Stammsammlung AG Mösch
BHUM2028	<i>P_{TDH3}-RFP, TRP1, Amp^r, CEN</i> Um den <i>LEU2</i> -Marker in BHUM2027 durch <i>TRP1</i> zu ersetzen, wurde dieser mit ClaI und der Zielvektor B2798 (pRS414) mit XhoI verdaut. Im Rahmen der <i>in vivo</i> Ligation wurden beide geschnittenen Plasmide in YHUM468 kotransformiert und positive Klone auf Platten ohne Tryptophan selektioniert.	pRS414	diese Arbeit
BHUM2029	<i>P_{TDH3}-GFP, TRP1, Amp^r, CEN</i> Um <i>RFP</i> in BHUM2028 durch <i>GFP</i> zu ersetzen, wurde <i>yeGFP</i> aus BHUM1184 (pYM12) mit den Oligonukleotiden GFP_hR_for und GFP_hR_rev amplifiziert, welche außerdem homologe Bereiche zu den Sequenzen vor und nach dem <i>RFP</i> -ORF in BHUM2028 aufweisen (inkl. Startcodon). BHUM2028 wurde mit XhoI verdaut und zusammen mit dem PCR-Fragment in YHUM468 kotransformiert, so dass per homologer Rekombination <i>RFP</i> durch <i>GFP</i> ersetzt wurde.	pRS414	diese Arbeit
BHUM2309 (pYM13)	<i>TAP-KANMX4, Amp^r</i> Zur C-terminalen, genomischen Markierung von Genen wurde die <i>TAP-KANMX4</i> -Kassette mit Hilfe von Oligonukleotiden amplifiziert, die einen 5'-Überhang zum Integrationsort besitzen (ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon unter Auslassung des Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der <i>TAP-KANMX4</i> -Kassette an das C-terminale Ende des entsprechenden ORFs unter gleichzeitiger Deletion des Stop-Codons.		(Janke et al., 2004)
BHUM2310	<i>Nip100¹⁰⁰⁶⁻¹⁹³⁵</i> in pJet1.2 Die <i>NIP100</i> -Sonde (1006 bis 1935 bp) wurde mit den Oligonukleotiden NS_Nip100+1006for und NS_Nip100+1935rev amplifiziert und „blunt-end“ in den Suizidvektor pJet1.2 (BHUM1424) ligiert.	pRS416	diese Arbeit

Plasmid	Genotyp/Beschreibung	Rückgrat	Referenz
BHUM2311 (pYM18)	<i>9myc-KANMX4, Amp^r</i> Zur C-terminalen, genomischen Markierung von Genen wurde die <i>9myc-KANMX4</i> -Kassette mit Hilfe von Oligonukleotiden amplifiziert, die einen 5'-Überhang zum Integrationsort besitzen (ca. 50 bp vor bzw. nach dem Stop-Codon unter Auslassung des Stop-Codons). Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion der <i>9myc-KANMX4</i> -Kassette an das C-terminale Ende des entsprechenden ORFs unter gleichzeitiger Deletion des Stop-Codons.		(Janke et al., 2004)
pCT271	<i>ura3::P_{GALI}-p14^{D122Y}-TEV^{S219V;234Stop}::KANMX::ura3, Amp^r</i> Integratives Plasmid, um die Codon-optimierte, verkürzte p14-TEV-Protease unter dem <i>GALI</i> -Promotor an den <i>URA3</i> -Lokus zu integrieren.	pRS306K	Stammsammlung AG Taxis
pCT330	<i>tagRFP-cODC-TDegF-KANMX4, Amp^r</i> Mit S2- und S3-Oligonukleotiden der pYM-Serie kann diese Kassette amplifiziert und zur C-terminalen Markierung von Genen analog zu Knop (1999) verwendet werden. Die konditional exprimierte TEV-Protease schneidet innerhalb des RFPs und führt somit zum proteasomalen Abbau des markierten Proteins [TIPI-System s.a. Taxis (2009)].		Stammsammlung AG Taxis
pRS306h	<i>ura3::hphNT1::ura3, Amp^r</i> Integratives Plasmid, das in den <i>URA3</i> -Lokus inseriert und Nourseothricin-Resistenz vermittelt.		Stammsammlung AG Taxis

4.2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sowie ihr jeweiliger Verwendungszweck sind in Tab. 13 aufgelistet.

Tab. 13: Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
ACT1_MM1	GCT GCT TTG GTT ATT GAT AAC GG	<i>ACT1</i> -Sonde
ACT1_MM2	CAC TTG TGG TGA ACG ATA GAT GG	<i>ACT1</i> -Sonde
ADA2_NS1	ACC CCA TTC TCT GTC CTG ATT	<i>ADA2</i> -Sonde
ADA2_NS2	TAC AAA GTT GCT GCT CGT CGT	<i>ADA2</i> -Sonde
Cln1-48bp	ACC ACT CCA CTG CTC GTT AG	Kontroll-PCR der <i>CLN1-GFP</i> - und <i>CLN1^{I-99}-GFP</i> -Markierung
Cln1+1682bp	ATG GAA AAG CGT AGT ATT CCG	Kontroll-PCR der <i>CLN1-GFP</i> - und <i>CLN1^{I-99}-GFP</i> -Markierung
Cln1tag1 (S3)	TAA TAG AGC GTC TTC GAT ATC GCT ATC GTT AAG GAA CCA CAA TAG CTC TCA ACT GCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>CLN1-GFP</i> -Markierung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
Cln1tag2 (S3b)	GCA GAC ATA TTA CCC AAT TGA ATT GTC CAA TGC AGA ACT ACT AAC TCA TTA CGA ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>CLN1¹⁻⁹⁹</i> -GFP-Markierung
Cln1tag3 (S2)	CGT AGT ATT CCG TTA TTA ATT AAG TAT ATA TGT AGG CTT GAT GAG AAA ATG GTC AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>CLN1-GFP</i> - und <i>CLN1¹⁻⁹⁹</i> - GFP-Markierung
Cln2-106bp	TGC TAG ACT CTA TAG CTG CC	Kontroll-PCR der <i>CLN2-GFP</i> - und <i>CLN2¹⁻⁹⁹</i> -GFP- Markierung
Cln2+1872bp	TAG ACT TGA GTG CCA TCA GC	Kontroll-PCR der <i>CLN2-GFP</i> - und <i>CLN2¹⁻⁹⁹</i> -GFP- Markierung
Cln2tag1 (S3)	ATC TAG CAG TGC CTC ATC TTT AAT TTC TTT TGG TAT GGG CAA TAC CCA AGT AAT ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>CLN2-GFP</i> -Markierung
Cln2tag2 (S3b)	TGC TAA ACC GGA CTA CTA TCC GAT TGA GCT ATC TAA TGC AGA ATT ACT TTC TCA CCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>CLN2¹⁻⁹⁹</i> -GFP-Markierung
Cln2tag3 (S2)	TTT TTG GTA CGT TTG GCA AAT TGG CAT TCA TTT ATC ATG AAA AGA ACA GGA ACT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>CLN2-GFP</i> - und <i>CLN2¹⁻⁹⁹</i> - GFP-Markierung
Cln3+1950bp	GTG ACT AGA GGA AGT AAG GAG	Kontroll-PCR der <i>CLN3-GFP</i> - und <i>CLN3¹⁻⁹⁹</i> -GFP- Markierung
Cln3-53bp	GCA TCT CCC TTT TAC TCT CG	Kontroll-PCR der <i>CLN3-GFP</i> - und <i>CLN3¹⁻⁹⁹</i> -GFP- Markierung
Cln3tag_1 (S3)	AAC TTC CTC TGT GGA TTG TGA TTT TAA TGA TAG TAG CAA CCT CAA GAA AAC TCG CCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>CLN3-GFP</i> -Markierung
Cln3tag_2 (S3b)	GTA TGC TAC CGC TAG TGG CAC TTC CAC CGC CAC TGC CGC CTC TGT CAG CGC TGC CCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>CLN3¹⁻⁹⁹</i> -GFP-Markierung
Cln3tag_3 (S2)	GCT TTG CAA ATT TTA ATT TAT TTG TTG TTA AAT GCA TTT TTT TTT TGT CGT TTC AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>CLN3-GFP</i> - und <i>CLN3¹⁻⁹⁹</i> - GFP-Markierung
DDAda2_1	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC AAT GTC AAA CA A GTT TCA CTG TG	BHUM1459
DDAda2_3	G TTC TTC TCC TTT ACT CAT TCT CGA GGT CGA CGC CAT CCA ATT CTG GCT CTG GA	BHUM1459
FLO11_MM1	TTG TCT CAA CCA CCG TCG TTA	<i>FLO11</i> -Sonde
FLO11_MM2	AAC TGG AAG AGC GAG TAG CAA	<i>FLO11</i> -Sonde
Flo8-84bp	CGT TAG TAA GTC ACT GAG GC	Kontroll-PCR der <i>FLO8-GFP</i> - und <i>FLO8¹⁻⁹⁹</i> -GFP- Markierung
Flo8+2582bp	TCG TTG CTG TGA AAA TGG TTC	Kontroll-PCR der <i>FLO8-GFP</i> - und <i>FLO8¹⁻⁹⁹</i> -GFP- Markierung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
Flo8tag1 (S3)	TCT CAA TTT ACT GGA TAC AAA TGA AAA TGA TTT CAA TTT TAT TAA TTG GGA AGG CCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>FLO8-GFP</i> -Markierung
Flo8tag2 (S3b)	CAC GGA ACA ACC GTA CAT GGC AAG CCA GTA TAA ACA AGA TTT GCA GAG TAA TAT TCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>FLO8^{l-99}-GFP</i> -Markierung
Flo8tag3 (S2)	TTT CCT GTC ATT AAG AGT TTT TAT TTT TTA TTA TAA TAC TCA ACA CGT GAC TTC AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>FLO8-GFP</i> - und <i>FLO8^{l-99}-GFP</i> -Markierung
GFP_hR_for	TTA GTT TCG ACG GAT TCT AGA ACT AGT GGA TCC AAG TCG ACG GTG CTA TGC GTA CGC TGC AGG TCG AC	BHUM2029
GFP_hR_rev	GGG GGG AGG GCG TGA ATG TAA GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGA AGT GGC GCG CAG TTA TTT	BHUM2029
Hst3_Son_1	GGG ACT CAT CAT GAG GAG ATG	<i>HST3</i> -Sonde
Hst3_Son_2	CCA CTA ACC ACG TAT TTG CCC	<i>HST3</i> -Sonde
HST4_SS1	TCT TAT GCA CTT CGC CTT TTG G	<i>HST4</i> -Sonde
HST4_SS2	CGT GGT GAT GAA GAA GAG ATG GAT	<i>HST4</i> -Sonde
KO_HST3_1	GGG ATT AAT TTA CAT ACA ACT AGA TCC ATC TTT CTC AAA ACA GCT GAA GCT TCG TAC GC	<i>HST3</i> -Deletion
KO_HST3_2	CCT CGA TTA TTT ATC GTT AAC TCA ATT TTA ATA GTT AAG TGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG	<i>HST3</i> -Deletion
KO_hst4_1	CAA CTG TAT TTT AAA ACT GTA AAT AAT ACT AAG CAG AAC CAC AAA CAG CTG AAG CTT CGT ACG C	<i>HST4</i> -Deletion
KO_hst4_2	TGC ATT AAT TTT ATC TCC AAC CTT TTT TGG TAG GAC AAA TAC TTT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G	<i>HST4</i> -Deletion
Nip100- 136bp_for	CAC ACT GAG ATT GTT GGC GTA	Kontroll-PCR der <i>NIP100-6HA</i> -Markierung
Nip100 +2853bp_rev	AAA AGA GAT GGA ATC TGG GC	Kontroll-PCR der <i>NIP100-6HA</i> -Markierung
Nip100_S3 (S3)	AGA GGA AAA ATA TAC GAC TCA AAT CTC AAA ATG TTG TTA CAT ATT ACA AAC GTA CGC TGC AGG TCG AC	<i>NIP100-6HA</i> -Markierung
Nip100_S2 (S2)	ATT TAT TTA CTG TAT TTG AAT GTT ATA GAC CTG CTA GAA TCA CTC AG TCA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	<i>NIP100-6HA</i> -Markierung
NS_Nip100 +1006for	GCA GGC ACA TAT ATC GAA GAA	<i>NIP100</i> -Sonde
NS_Nip100 +1935rev	CGA GTT TGA AAA ATT GCC CTC	<i>NIP100</i> -Sonde
Mig2-52bp	ACG CTA AGA CTA TTG ACC TCG	Kontroll-PCR der <i>MIG2-GFP</i> -, <i>MIG2^{l-99}-GFP</i> - und <i>P_{MIG2}-GFP</i> -Markierung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
Mig2+1182bp	TTC ATG ACA GTT CGT TAG AGG	Kontroll-PCR der <i>MIG2-GFP</i> -, <i>MIG2¹⁻⁹⁹-GFP</i> - und <i>P_{MIG2}-GFP</i> -Markierung
Mig2_S3c (S3c)	GCTTAAGCAGTGCATGAATTATAGCTGATT GTGTGAAAGAATCTTTTTTTTGGGTCGTAC GCTGCAGGTCGAC	<i>P_{MIG2}-GFP</i> -Markierung
Mig2tag1 (S3)	GCC TGT ACG TAA CCT ACT GAA ACA AAT TGA TGT TTT CAA CGG TCC CAA AAG AGT TCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>MIG2-GFP</i> -Markierung
Mig2tag2 (S3b)	ACC TTT TAG ATG TGA TAC CTG TCA CCG TGG TTT CCA TCG GTT AGA ACA TAA AAA GCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>MIG2¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Mig2tag3 (S2)	TCA TGA CAG TTC GTT AGA GGA AAA ATG GTG AGA TAA AAA GGG GCC GTA AAG GTT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>MIG2-GFP</i> -, <i>MIG2¹⁻⁹⁹-GFP</i> und <i>P_{MIG2}-GFP</i> - Markierung
Mpt5-79bp	CCT CAA CTC CTC TCC AAC AC	Kontroll-PCR der <i>MPT5-GFP</i> - und <i>MPT5¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Mpt5+3322bp	TAG TAG GAC GTC ATT GCT TAG	Kontroll-PCR der <i>MPT5-GFP</i> - und <i>MPT5¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Mpt5tag1 (S3)	TAT GCC TGC CAT GAA TAC CGC TAG AAC ATC TGA TGA ACT TCA ATT CAC TTT GCC ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>MPT5-GFP</i> -Markierung
Mpt5tag2 (S3b)	TGG AGC ATA AGC TTT AAC GGG ATC TTC TAA CAA CAA ATA GCA TAA TAA CCA AAA ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>MPT5¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Mpt5tag3 (S2)	GCG TAA AAT ATT TGT ACA GTA AGA AGG AAA GAA AAA GAA AGA AAA AAA AGT ATT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>MPT5-GFP</i> - und <i>MPT5¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
PGK1_for	AAC CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG CTG GAG CTC ATC TTG TTT TGC AAG TAC CAC	BHUM1459
PGK1_rev	ATC GAA TTC CTG CAG CCC GGG GGA TCC ACT AGT TGT TTT ATA TTT GTT GTA AAA AGT A	BHUM1459
Phd1-290bp_For	TTC GTT TGC AAA AGA AGG CG	Kontroll-PCR der <i>PHD1-GFP</i> - und <i>PHD1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Phd1+1596bp_Rev	AGC CAA CGC TCT CTT TTT GT	Kontroll-PCR der <i>PHD1-GFP</i> - und <i>PHD1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Phd1_S3 (S3)	AAT CAA CCA TAT CGA TAC TGA GGC CCA AAC AAG TAG AGC AAA AAA TGA ATT ATC ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>PHD1-GFP</i> -Markierung
Phd1_S3b (S3b)	CAC TCA ATC TAA CGC CGC AAT AAC ACC CAC CAG AAG TTA CGA CAA TAC CCT TCC TCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>PHD1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
Phd1_S2 (S2)	GAA CTT CGG TTC TTG TTC ATA GAG CAA AGA GTT AAC GGA TTA TGT TAT GTG CTT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>PHD1-GFP</i> - und <i>PHD1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
pUG72KO +852bp	GGA CCC AAC GTT TCA ACA AG	Kontroll-PCR der <i>HST3</i> - und <i>HST4</i> -Deletion
SQYAK1- 66bp	GCA ACA GCC ATT GTG CAA G	Kontroll-PCR der <i>YAK1-GFP</i> - und <i>YAK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
SK-TEC1(t)1	CTG TGA CGG TTC TTA CTA CG	Kontroll-PCR der <i>TEC1-GFP</i> - und <i>TEC1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tec1_KO	GCT CAT GCA CAG TTA AAA AGC	Kontroll-PCR der <i>TEC1-GFP</i> - und <i>TEC1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tec1-S3 (S3)	CAA AGG AAC TTT ACG CCA TCC AAC CAA TCG CAT GGG AAC TTT TAT CGT ACG CTG CAG GTC GAC	<i>TEC1-GFP</i> -Markierung
Tec1tag2 (S3b)	TAT AGA ATC ATA TAC TGG TAG AAT TTT TGA CGT ATA TAT ACA AAA AGA TTC GTA TCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>TEC1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tec1-S2 (S2)	TAT GCG TAT TTA TGT ACG AGA TGT ATG TAT GTA TGT AGA CAT TTA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	<i>TEC1-GFP</i> - und <i>TEC1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk1-95bp_ For	AAT CGG CTT CAA AGG TAG CA	Kontroll-PCR der <i>TPK1-GFP</i> - und <i>TPK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk1+1474bp_ Rev	CCT TCA TTT CAT GAT GCA AGC	Kontroll-PCR der <i>TPK1-GFP</i> - und <i>TPK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk1_S3 (S3)	CAT CAA CTA CGG TGT TCA AGG TGA AGA CCC ATA TGC TGA TCT TTT CCG GGA CTT CCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>TPK1-GFP</i> -Markierung
Tpk1_S3b (S3b)	TGA TAG ACA AGG TGA GGA ATC ACA AAA AGG TGA GAC TAG TGA AAG GGA AAC AAC ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>TPK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk1_S2 (S2)	ATA TGA AAA AAA AAA AAT ATA GAT ACG AGA GGA AAA TAC AAC AAA ACA TTA GTC ATT AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	<i>TPK1-GFP</i> - und <i>TPK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk2-54bp	GGC ACA AAC AGC AGC TTC AC	Kontroll-PCR der <i>TPK2-GFP</i> - und <i>TPK2¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk2_gTVrev	TTA GGG CAA CGC TTG TTC TTC	Kontroll-PCR der <i>TPK2-GFP</i> und <i>TPK2¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk2gTagfw (S3)	GGT ATT CAA GGC GAT GAT CCA TAT GCT GAA TAC TTT CAA GAT TTC CGT ACG CTG CAG GTC GAC	<i>TPK2-GFP</i> -Markierung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
Tpk2tag2 (S3b)	CCA GCA GCA AAA TGT TAA TAC TTA CGG GCA AGG CGT CCT ACA ACC GCA TCA TGA TCG TAC GCT GCA GGT CGA C	<i>TPK2¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Tpk2gTagrv (S2)	AGA AAG TAC TTG AAA ATT GTT TTT GTG TTT TTT GGT TCA TGG AAC ATC GAT GAA TTC GAG CTC G	<i>TPK2-GFP</i> - und <i>TPK2¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Yak1tag1 (S3)	ATT CTG TTC AAG AAG GGC CAA CAA GCG CGT TCA ATA AAC TTC ACA TTG TCG AAG AAC GTA CGC TGC AGG TCG AC	<i>YAK1-GFP</i> -Markierung
Yak1tag2 (S2)	AAG CCG TAA TAA AAT GAA ATG GGT AGT TAA GAA AAG TCA GAC AAA ATA ACG ATT TAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG	<i>YAK1-GFP</i> - und <i>YAK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Yak1tag3 (S3b)	ACA TGA ATA ACT CCT TGA GCC CGA CCC TTG TGA CCC ACA GTG ATG CTA GTA TGG GCC GTA CGC TGC AGG TCG AC	<i>YAK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Yak1Term_2	TTG GTT GGT ACC GGA AGT ACC CTT ATT CGG C	Kontroll-PCR der <i>YAK1-GFP</i> - und <i>YAK1¹⁻⁹⁹-GFP</i> -Markierung
Whi3tag_1 (S3)	CTA ATG TAA ATA TGC TTT CCA GTT ACA ATT CTA ATG TTG GTC ATA TAA AAA AC C GTA CGC TGC AGG TCG AC	C-terminale Markierung von <i>WHI3</i>
Whi3tag_2 (S2)	CAT ATA ATG TGA TAC ATG CAA GGA AAT CAG GTT TTT GCG GAA CCA TTT TTT TA A TCG ATG AAT TCG AGC TCG	C-terminale Markierung von <i>WHI3</i>
Whi3_Kofw	CTT TAT CGA TCA ATA TTT CAG AGG GAA AAA CCT GTA TCT CTT AGC CAG CTG AAG CTT CGT ACG C	<i>WHI3</i> -Deletion
Whi3_Korev	AAT GTG ATA CAT GCA AGG AAA TCA GGT TTT TGC GGA ACC ATT TTT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G	<i>WHI3</i> -Deletion
Whi3_S1 (S1)	GCA GCC TTT ATC GAT CAA TAT TTC AGA GGG AAA AAC CTG TAT CTC TTA GCA TGC GTA CGC TGC AGG TCG AC	N-terminale Markierung von <i>WHI3</i>
Whi3_S4 (S4)	TCG CTA CTG GAC GCA AAT GAC CCT GTT TGG TCA AAA TAA ACT GAA CTT TGC ATC GAT GAA TTC TCT GTC G	N-terminale Markierung von <i>WHI3</i>
Whi3_Ssfw	TGC GAC TAC GGT CTC ATC AGT TC	<i>WHI3</i> -Sonde
Whi3_Ssrev	GGA CGG AAT AAA CAA CTG TGC G	<i>WHI3</i> -Sonde

5 METHODEN

5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *Escherischia coli*

Die *E. coli* Stämme wurden in LB-Vollmedium (Tab. 4) über Nacht inkubiert und ggf. am darauffolgenden Tag 1:100 verdünnt in frischem LB-Medium bei 37 °C schüttelnd angezogen. Zur Selektion von Plasmiden wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Feste Medien enthielten 2% (w/v) Agar.

Das Wachstum der *E. coli* Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gegen das verwendete Medium verfolgt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 einer Zelldichte von 2×10⁸ Zellen pro ml (Sherman et al., 1986). Die Wachstumsdauer und Zelldichte wurden nach folgender Formel berechnet.

$$v_I = \frac{v_{HK} \times OD_t}{OD_P} \times e^{\mu \Delta t}$$

v_I = Impfvolumen (ml)

OD_P = OD₆₀₀ der Primärkultur

v_{HK} = Volumen der Hauptkultur (ml)

μ = Wachstumsrate (h⁻¹)

OD_t = gewünschte OD₆₀₀ nach Zeit t

Δt = Wachstumszeit (h)

5.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae Zellen wurden in Voll- (YEPD-), synthetischem (SC-) oder Minimal- (YNB-) Medium (Tab. 4) auf einem Dreh- oder Rotationsschüttler bei 30 °C angezogen. Als C-Quellen dienten 2% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Galaktose oder 2% (w/v) Saccharose. Je nach Stammhintergrund wurden dem SC- bzw. YNB-Medium entsprechende Aminosäuren wie 0,3 mM L-Histidin, 1,7 mM L-Leucin, 0,4 mM L-Tryptophan und 0,2 mM Uracil zugesetzt (Sherman et al., 1986). Zur Induktion der Cre-Rekombinase im Rahmen der Herstellung von Deletionsmutanten nach Gueldener (2002) wurde das Vollmedium YEPG verwendet. Feste Medien enthielten 2% (w/v) Agar. Die Antimykotika Geneticin (G418) und Nourseothricin wurden in einer Endkonzentration von 200 µg/ml, 5-FOA mit 1 mg/ml zur Selektion in festen Medien angewendet.

Um den Einfluss verschiedener Stressbedingungen auf die *FLO11*-, *WHI3*- bzw. *YAK1*-Expression zu untersuchen, wurden die jeweiligen *S. cerevisiae* Stämme zunächst über Nacht

in YNB-Medium mit 0,4 mM L-Tryptophan und ggf. 0,2 mM Uracil (YNB+Trp bzw. YNB+Trp+Ura) angezogen und am darauffolgenden Tag in frischem Medium von einer OD₆₀₀ von 0,25 bis 0,6 (logarithmische Phase) kultiviert. Nach der Aufteilung der Kulturen auf mehrere Erlenmeyerkolben wurde jeder Stamm einerseits als Kontrolle bei 30 °C für weitere 3 h inkubiert oder mit 10 mM 3-Aminotriazol (3AT) bzw. 0,11 µM Rapamycin (R) versetzt und ebenfalls für 3 h kultiviert. Alternativ wurden die Kulturen für 3 min bei 2.000 min⁻¹ pelletiert, mit YNB-Medium ohne Glukose gewaschen und anschließend in YNB-Medium mit 2% (w/v) Glukose (Kontrolle), 0,1% (w/v) Glukose oder 2% (w/v) Saccharose für weitere 2 h (2% Glc, 0,1% Glc) bzw. 3 h (2% Sacch) inkubiert. Um den Effekt eines Hitzestresses zu untersuchen, wurden die Kulturen alternativ bei OD₆₀₀ = 0,8 aufgeteilt und entweder für 1 h bei 30 °C oder bei 37 °C angezogen. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurden 1,5 OD bzw. 25 OD der Kulturen für spätere Protein- bzw. RNA-Analysen entnommen. Mikroskopische Untersuchungen von *S. cerevisiae* wurden, wenn nicht anders angegeben, in LFM-Medium mit 0,4 mM L-Tryptophan und 0,2 mM Uracil durchgeführt (siehe Tab. 4).

Das Wachstum der *S. cerevisiae* Zellen wurde durch Messung der OD₆₀₀ gegen das verwendete Medium bestimmt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 einer Zelldichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen pro ml (Sherman et al., 1986). Die Wachstumszeiten und Zelldichten wurden nach der in Kapitel 5.1.1 angegebenen Formel bestimmt.

5.2 Methoden zur Transformation und genomischen Manipulation

5.2.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen [modifiziert nach Mandel und Higa (1970)]

Herstellung chemisch kompetenter E. coli Zellen

Die verwendeten Bakterienstämme wurden zunächst über Nacht in SOB-Medium schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die 1:100 verdünnte Hauptkultur wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 4.000 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Das in RF1 resuspendierte Pellet wurde weitere 15 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 2.500 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtiger Lösung des Pellets in RF2 und erneuter Ruhephase für 15 min auf Eis wurden je 50 µl kompetente Zellen aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Transformation chemisch kompetenter E. coli Zellen

50 µl Aliquots wurden kurz auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 5 µl Plasmid-DNA versetzt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 45 sec. Nach einstündiger Regenerationphase bei 37 °C in LB-Medium, wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.2 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen***Herstellung elektrokompenter E. coli Zellen***

Die über Nacht bei 37 °C angezogene Bakterienkultur wurde am darauffolgenden Tag 1:100 in 200 ml frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Nach einer 15-minütigen Ruhephase auf Eis wurden die Zellen 5 min bei 5.000 min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert und zweimal mit eiskaltem Wasser gewaschen (1× mit 50 ml, 1× mit 30 ml). Dann wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen, erneut zentrifugiert und schließlich in 400 µl eiskaltem 10%igem (v/v) Glycerin resuspendiert. Es wurden je 50 µl kompetente Zellen aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Transformation elektrokompenter E. coli Zellen

Die kompetenten, gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (1 mm Spaltbreite) überführt. Pro Ansatz wurden 10 bis 100 ng DNA transformiert (1 µl „Smash & Grab“-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes) und für 1 min auf Eis inkubiert. Mit Hilfe eines „Gene PulserTM“ wurden die Zellen einem elektrischen Puls (2,5 kV Spannung, 200 Ω Widerstand, 25 µF Kapazität) ausgesetzt, um die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle zu ermöglichen. Die dafür verwendete Zeit sollte optimaler Weise zwischen 4,6 und 4,8 ms liegen. Es folgte eine Erholungsphase bei 37 °C in 1 ml lauwarmem LB-Medium. Nach zweiminütiger Pelletierung bei 6.000 min⁻¹ wurden die Zellen in ca. 50 µl Restflüssigkeit resuspendiert, auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.3 Herstellung und Transformation von kompetenten *S. cerevisiae* Zellen [„SORB“-Methode, modifiziert nach Knop et al. (1999)]***Herstellung kompetenter S. cerevisiae Zellen***

Der verwendete Hefestamm wurde zunächst über Nacht in flüssigem YEPD-Medium bei 30 °C auf einem Rollinkubator angezogen und am nächsten Tag in 50 ml frischem YEPD-

Medium von $OD_{600} = 0,2$ bis $OD_{600} = 0,7$ kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen für 3 min bei 2.000 min^{-1} abzentrifugiert, zweimal mit 15 ml Wasser bzw. 10 ml SORB gewaschen und schließlich in 360 μl SORB und 40 μl frisch denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml; 10 min bei 100°C denaturiert und auf Eis abgekühlt) aufgenommen. Je 50 μl kompetente Zellen wurden bei -70°C gelagert oder direkt für eine Transformation verwendet.

Transformation kompetenter S. cerevisiae Zellen

Für eine Transformation wurden 50 bzw. 200 μl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 μg Plasmid-DNA bzw. 30 μl gefälltem PCR-Ansatz sowie dem sechsfachen Volumen PEG versetzt. Es folgte eine 30- bzw. 45-minütige Inkubation bei 30°C und ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C . Anschließend wurden die Zellen bei 2.000 min^{-1} für 2 min zentrifugiert und mit 1 ml YEPD gewaschen. Nach einer ein- bzw. dreistündigen Regenerationsphase in 1 ml YEPD bei 30°C wurden die Zellen erneut zentrifugiert, das Pellet im Restmedium resuspendiert und auf festem Selektivmedium für drei Tage bei 30°C inkubiert.

5.2.4 Generierung von genomischen Gendeletionen (Gueldener et al., 2002)

Analog zu Gueldener (2002) wurden *WHI3*, *HST3* und *HST4* genomisch mit Hilfe des *loxP*-Systems deletiert. Zu diesem Zweck wurde mit den entsprechenden Forwärts- und Rückwärts-Oligonukleotiden eine ca. 2,5 kb große *loxP-URA3-loxP*-Kassette aus BHUM969 (pUG72) per PCR in einem 200 μl Ansatz amplifiziert (siehe Tab. 12 und 13). Nach der Fällung des gesamten PCR-Ansatzes mit 1 ml eiskaltem 100%igen (v/v) Ethanol und der Aufnahme des Pellets in 30 μl Wasser wurden diese in 200 μl kompetente Zellen transformiert, um den Austausch des zu deletierenden Gens mit der *loxP-URA3-loxP*-Kassette per homologer Rekombination zu ermöglichen. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf festem SC-Medium ohne Uracil (SC-Ura) für drei Tage. Zur Überprüfung der erfolgreichen Deletion wurden die resultierenden Kolonien per PCR sowie mit Hilfe einer Southern-Analyse untersucht. Um anschließend die *URA3*-Kassette wieder aus dem Genom zu entfernen, wurden die positiven Klone mit BHUM973 (pSH63) transformiert, welches für die Galaktose-induzierbare Cre-Rekombinase kodiert. Die entsprechenden Stämme wurden für 3 h in YEPG kultiviert und auf 5-FOA-haltigen SC+Trp+Ura-Platten ausplattiert. Die resultierenden *URA3*-defizienten Stämme wurden erneut mit Hilfe einer PCR und Southern-Analyse untersucht.

5.2.5 Generierung von genomisch markierten Genen (Knop et al., 1999)

Zur genomischen, N- oder C-terminalen Markierung von Genen wurden entsprechende Markierungskassetten aus BHUM1184 (pYM12), BHUM1880, BHUM2037 (pYM14), BHUM2309 (pYM13), BHUM2311 (pYM18) und pCT330 per PCR amplifiziert. Die dabei verwendeten Oligonukleotide enthalten ca. 45 bis 55 bp lange 5'-Überhänge, die komplementär zum Integrationsort sind und die Insertion der Markierungskassette ins Genom per homologer Rekombination erlauben (Knop et al., 1999; Janke et al., 2004). Im Speziellen wurden für die N-terminale Markierung von *WHI3* ein S4- und S1-Oligonukleotid verwendet, deren 5'-Überhang komplementär zu 45 bis 55 bp vor dem Startcodon (inkl. ATG) bzw. nach dem Startcodon ist, während die C-terminale, vollständige Markierung von Genen mit S3- und S2-Oligonukleotiden durchgeführt wurde, deren 5'-Enden Homologien zu 45 bis 55 bp vor dem Stopcodon bzw. nach dem Stopcodon aufweisen (Tab. 13). Zur Herstellung von verkürzten, C-terminal markierten GFP-Konstrukten wurde neben dem S2-Oligonukleotid ein alternatives S3b-Oligonukleotid verwendet, das komplementär zu den Basenpaaren 44 bzw. 55 bis 99 bp des entsprechenden ORFs ist. Auf diese Weise führte die Insertion der Markierungskassette zu einer fast vollständigen Deletion des jeweiligen ORFs und einer Markierung der ersten 99 bp mit *GFP*. Je 300 µl PCR-Ansatz wurden mit 1 ml eiskaltem 100%igen (v/v) Ethanol gefällt, in 30 µl Wasser aufgenommen und anschließend in 200 µl kompetente Hefezellen transformiert. Nach der erfolgten Insertion der Markierungskassette wurden positive Klone auf entsprechendem Selektionsmedium angezogen. Zur Verifizierung der korrekten Markierung wurden die resultierenden, vereinzelter Klone mit Hilfe einer PCR untersucht, deren Oligonukleotide außerhalb der Markierungskassette binden (siehe Tab. 13). Im Fall der C-terminalen Markierung von *WHI3* mit *GFP*-TDegF-3HA* aus BHUM1880 (*loxP-URA3-loxP-GFP*-TDegF-3HA*-Kassette) wurde der *URA3*-Marker wieder aus dem Genom entfernt, um *WHI3* von seinem nativen Promotor aus zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurden positive Klone mit BHUM973 (pSH63) transformiert, auf SC-Platten ohne Tryptophan sowie Uracil (SC-Trp-Ura) selektioniert und anschließend für 3 h in YEPG kultiviert, um die Expression der Cre-Rekombinase und somit die Exzision des *URA3-loxP*-Fragmentes zu induzieren. *URA3*-defiziente Stämme wurden auf festem, 5-FOA-haltigem SC+Trp+Ura-Medium selektioniert.

Alle C-terminal markierten Gene weisen nach der Insertion der Markierungskassette eine neue Terminatorregion und 3'-UTR auf, welche aus dem jeweils verwendeten Plasmid stammen. Die korrekte Markierung sowie stabile Expression der N- bzw. C-terminal

markierten Gene wurde mit Hilfe von Western-Analysen und ggf. mikroskopischen Aufnahmen verifiziert.

5.3 Präparation von DNA

5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit dem „Plasmid Mini-Kit“

Eine Einzelkolonie eines Plasmid-tragenden *E. coli* Stamms wurde zunächst über Nacht in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C auf einem Rollinkubator angezogen. Am darauffolgenden Tag wurde das Plasmid mit Hilfe des „Plasmid Mini-Kits“ entsprechend den Hersteller-Angaben aufgereinigt und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bei 260 nm unter Verwendung des „Nano Drop® ND Spectrophotometers“ bestimmt. Zu Lagerungszwecken wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C aufbewahrt.

5.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels alkalischer Lyse (Birnboim and Doly, 1979)

Die Anzucht einer Einzelkolonie eines Plasmid-tragenden *E. coli* Stamms erfolgte über Nacht in 1,5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C auf einem Rollinkubator. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 6.000 min⁻¹ wurde der Überstand verworfen und das Pellet zunächst in 100 µl Lösung I resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde durch die Zugabe von 200 µl Lösung II induziert und das Reaktionsgefäß mehrmals vorsichtig invertiert. Anschließend folgte die Neutralisierung des Ansatzes durch Zugabe von 150 µl Lösung III und einer fünfminütigen Inkubation auf Eis. Das DNA-Gemisch wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes (10 min bei 13.000 min⁻¹) von den Zelltrümmern und den denaturierten Proteinen abgetrennt und der Überstand mit 700 µl eiskaltem 100%igen (v/v) Ethanol in einem frischen Reaktionsgefäß gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation bei -20 °C wurde der Ansatz erneut zentrifugiert (10 min bei 13.000 min⁻¹), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und das resultierende, luftgetrocknete Pellet in 20 µl Wasser aufgenommen. Die Lagerung der DNA-Lösung erfolgte bei -20 °C.

5.3.3 Isolierung der Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*: „Smash & Grab“ (Hoffman and Winston, 1987)

Der gewünschte Hefestamm wurde in 10 ml Voll- (YEPD-) oder Selektionsmedium über Nacht bei 30 °C auf einem Rollinkubator angezogen. Am darauffolgenden Tag wurden die Hefezellen durch Zentrifugation bei 3.000 min⁻¹ für 5 min pelletiert und mit 500 µl Wasser in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation wurde dem Pellet 400 µl S&G-Puffer, 300 µl „Roti® Aqua Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur DNA-Isolierung“ (Verhältnis 25:24:1) und 600 mg Glasperlen (ø 0,25 bis 0,5 mm) zugegeben und die Zellen auf einem „Vibrax Basic“ bei 4 °C für 10 min aufgebrochen. Die wässrige, DNA-haltige Lösung wurde von den Zelltrümmern und denaturierten Proteinen durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 13.000 min⁻¹) abgetrennt und der Überstand mit 1 ml eiskaltem 100%igem (v/v) Ethanol für 1 h bei -20 °C in einem neuen Reaktionsgefäß gefällt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (10 min bei 13.000 min⁻¹) und das Pellet mit 400 µl TE-Puffer und 3 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) versetzt, um die verbleibende RNA zu degradieren. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die DNA erneut mit 1 ml eiskaltem 100%igem (v/v) Ethanol gefällt, zentrifugiert, luftgetrocknet und in 50 µl TE- oder EB-Puffer aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Die auf diese Weise hergestellte DNA-Lösung wurde entweder zur Überprüfung von genomischen Markierungen als Matrize in eine PCR eingesetzt bzw. für eine Southern-Analyse verwendet oder zur Zurückgewinnung von Plasmiden in elektrokompetente *E. coli* transformiert.

5.4 Manipulation von DNA

5.4.1 Polymerase Kettenreaktion: PCR [modifiziert nach Saiki et al. (1992)]

Zur Amplifizierung der Markierungs- bzw. Deletionskassetten sowie zu Klonierungszwecken wurden die „Phusion-High-Fidelity“- sowie die „KOD-HiFi“-Polymerase verwendet, während ein Gemisch aus selbst aufgereinigter Taq- und Pfu-Polymerase im Verhältnis 1:1 für die Generierung von DIG-markierten DNA-Sonden sowie zur Überprüfung von genomischen Markierungen bzw. Deletionen eingesetzt wurde. Als Matrize dienten entweder 1:10 verdünnte Plasmid- oder Gesamt-DNA, die analog zu Kapitel 5.3.1, 5.3.2 bzw. 5.3.3 aus *E. coli* bzw. *S. cerevisiae* isoliert wurden. Tab. 14 enthält eine Übersicht über die Zusammensetzung eines typischen 50 bzw. 20 µl Ansatzes der jeweiligen Polymerasen.

Tab. 14: Beispielhafte Zusammensetzung eines 50 bzw. 20 µl Ansatzes der in dieser Arbeit verwendeten Polymerasen.

Phusion-Polymerase		KOD-Polymerase		Taq-/Pfu-Polymerase	
10 µl	Phusion® HF-Puffer (5×)	5 µl	KOD Puffer 1 (10×)	2 µl	Puffer SM
2 µl	dNTPs (10 mM)	5 µl	KOD-dNTPs (2 mM)	0,6 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	Oligo 1 (20 mM)	1 µl	Oligo 1 (20 mM)	0,2 µl	Oligo 1 (20 mM)
1 µl	Oligo 2 (20 mM)	1 µl	Oligo 2 (20 mM)	0,2 µl	Oligo 2 (20 mM)
1 µl	Matrize	1 µl	Matrize	0,5 µl	Matrize
0,5 µl	Phusion-Polymerase	0,5 µl	KOD-Polymerase	0,8 µl	Taq-/Pfu-Polymerase
34,5 µl	Wasser	34,5 µl	Wasser	15,1 µl	Wasser
		2 µl	MgCl ₂	0,8 µl	MgCl ₂
50 µl		50 µl		20 µl	

Die Art und Dauer des Temperaturprofils ist in Tab. 15 dargestellt. Es können fünf Schritte während einer PCR unterschieden werden: die initiale (1.) und erneute Denaturierung (2.), die Hybridisierung der Oligonukleotide mit der Matrize (3.), die Elongation (4.) und finale Elongation (5.). Dabei wurden die Schritte zwei bis vier 25 bis 30 Mal wiederholt. Die Dauer der Elongation in Schritt vier richtete sich nach der Länge des Amplifikats.

Tab. 15: Übersicht über das Temperaturprofil der in dieser Arbeit verwendeten Polymerasen.

Phusion-Polymerase			KOD-Polymerase		Taq-/Pfu-Polymerase	
1.	98 °C	30 sec	98 °C	30 sec	94 °C	5 min
2.	98 °C	10 sec	98 °C	10 sec	94 °C	30 sec
3.	55-58 °C	20 sec	55-58 °C	20 sec	52-55 °C	40 sec
4.	72 °C	x sec (1 kb pro sec)	72 °C	x sec (106-138 bp pro sec)	72 °C	x sec (1 kb pro min)
5.	72 °C	3 min	72 °C	3 min	72 °C	3 min

Die PCR erfolgte im PCR-Block „Primus 25 advanced“ oder „Primus 96 advanced“.

5.4.2 Fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde zunächst mit dem mindestens zweifachen Volumen eiskalten 100%igen (v/v) Ethanol versetzt und für 10 min bis 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach der Pelletierung der Nukleinsäuren bei 13.000 min⁻¹ für 5 min wurden diese mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und das luftgetrocknete Pellet schließlich in 30 µl Wasser oder EB-Puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

5.4.3 Restriktion von DNA

Die restriktionsenzymatische Spaltung von doppelsträngiger DNA wurde mit verschiedenen DNA-Endonukleasen und den entsprechenden Puffersystemen der Firmen FERMENTAS und NEW ENGLAND BIOLABS Inc. durchgeführt. Für den gleichzeitigen Verdau mit zwei Enzymen wurden die vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen verwendet. Prinzipiell

wurden im Rahmen einer analytischen Restriktion ca. 500 ng DNA und 1 bis 2 U DNA-Endonuklease in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt, während die Mengen für einen analytischen Verdau je nach Bedarf entsprechend angepasst wurden. Die thermale Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte bei 65 °C bzw. 80 °C für 20 min.

5.4.4 Dephosphorylierung und *in vitro* Ligation von DNA

Um die Religation von enzymatisch verdauter Plasmid-DNA zu verhindern, wurde die linearisierte DNA direkt nach der Restriktion mit 1 Unit „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP) versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die thermale Inaktivierung der SAP erfolgte für 15 min bei 65 °C.

Zu Klonierungszwecken wurden ca. 50 ng geschnittene, dephosphorylierte Plasmid-DNA und die dreifache Menge „Insert“ mit Hilfe von 1 bis 5 U der T4-DNA-Ligase entsprechend den Angaben des Herstellers über Nacht bei 16 °C ligiert. 5 µl dieses Ansatzes wurden ohne vorherige Hitzeinaktivierung in 50 µl kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

5.4.5 *In vivo* Ligation von DNA in *S. cerevisiae*

Diese Klonierungsmethode basiert auf der Fähigkeit von *S. cerevisiae* zur homologen Rekombination. Dabei wurden zunächst ca. 1,5 µg Zielvektor unter Verwendung von 5 U eines geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Ferner wurde das gewünschte „Insert“ per PCR amplifiziert und auf diese Weise mit überhängenden Enden versehen, die homolog zu Sequenzen innerhalb des Zielvektors sind. Nach der Fällung von 150 µl PCR-Ansatz und der Aufnahme des DNA-Pellets in 15 µl Wasser wurden sowohl das „Insert“ als auch der linearisierte Vektor in 200 µl kompetente Hefezellen kotransformiert. Per homologer Rekombination erfolgte die Insertion des PCR-Produktes in den Zielvektor und die gleichzeitige Zirkularisierung des Vektors. Positive Klone wurden auf entsprechendem Festmedium selektioniert und die Gesamt-DNA isoliert („Smash & Grab“, Kapitel 5.3.3). 5 µl dieser DNA-Lösung wurden in 50 µl elektrokompente *E. coli* Zellen transformiert, die generierten Plasmide auf diese Weise vereinzelt und anschließend isoliert. Die Überprüfung der korrekten Insertion erfolgte durch einen Restriktionsverdau und die Sequenzierung des Plasmids.

Neben der Insertion von gewünschten PCR-Fragmenten wurde die *in vivo* Ligation ebenfalls zum Austausch des metabolischen Markers von Plasmiden verwendet, die homologe Bereiche zueinander aufweisen. Dabei wurden je 1,5 µg beider Plasmide mit entsprechenden

Restriktionsenzymen linearisiert, in *S. cerevisiae* kotransformiert und die Zellen hinsichtlich des metabolischen Zielmarkers selektioniert. Da die Ausgangsplasmide aufgrund der Linearisierung nicht erhalten wurde, konnten auf diese Weise Vektoren isoliert werden, die aus einer erfolgreichen homologen Rekombination hervorgegangen sind.

5.4.6 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe wurde mit Hilfe von 1%igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer bei 130 V und automatisch angepasster Stromstärke für 30 bis 60 min durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die DNA-Lösung mit 6× DNA-Probenpuffer versetzt und der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ als Größenstandard verwendet. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Agarosegele zunächst für ca. 10 min in einer 1 µg/ml Ethidiumbromidlösung geschwenkt, für 10 min in einem Wasserbad entfärbt und die DNA-Banden schließlich mit Hilfe eines „GelDoc XR Systems“ und der Software „Quantity One 1-D“ bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert.

5.4.7 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die präparative Isolierung von PCR-Amplifikaten oder restriktionsenzymatisch gespaltenen DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Stücke nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Skalpell unter dem UV-Transilluminator „IL-200-M“ bei 365 nm ausgeschnitten. Diese Gelstücke wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Hilfe des „E.Z.N.A.® Gel Extraction Kits“ oder des „QIAquick Gel Extraction Kits“ entsprechend den Hersteller-Angaben isoliert. Die Elution erfolgte in 30 µl Wasser. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde an Hand eines weiteren Agarosegels bestimmt und die DNA-Lösung bei -20 °C gelagert.

5.4.8 Herstellung von DIG- oder radioaktiv markierten DNA-Sonden für die Southern- bzw. Northern-Analyse

Für die Detektion von DNA- bzw. RNA-Fragmenten im Rahmen einer Southern- oder Northern-Analyse wurden ca. 400 bis 1.000 bp große, DIG- oder radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet, die in einer PCR mit genomischer oder Plasmid-DNA als Matrize amplifiziert wurden. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 13 aufgelistet.

DIG-markierte DNA-Sonden wurden mit Hilfe der Pfu-Polymerase unter Verwendung des „PCR DIG Labeling Mixes“ nach den Angaben des Herstellers amplifiziert. Dabei richteten

sich die Art und Dauer des Temperaturprofils nach den verwendeten Oligonukleotiden und der Länge der gewünschten Sonde. DIG-markierte Sonden wurden bei -20 °C gelagert und konnten bis zu 10-mal wiederverwendet werden.

Die Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden erfolgte unter Verwendung des „Amersham Megaprime™ DNA Labeling Systems“. Dabei wurden 50 ng DNA zunächst mit 5 µl „Random Primer Mix“ in 33 µl Gesamtvolumen für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend 10 µl „Labelling Mix“, 2 µl Klenow-Polymerase sowie 5 µl (α -P³²)dCTP mit einer Aktivität von 18,5 MBq zugegeben. Die lineare Amplifizierung der DNA-Sonde wurde bei 37 °C für 30 min durchgeführt und die Reaktion durch Zugabe von 3 µl 0,5 M EDTA-Lösung abgestoppt. Anschließend wurde die auf diese Weise hergestellte Sonde mit Hilfe einer „MobiSpin S200“-Säule durch zweiminütige Zentrifugation bei 2.800 min⁻¹ aufgereinigt. Es folgte eine erneute Denaturierung der DNA-Sonde bei 99 °C für 5 min. Die radioaktiv markierten Sonden wurden bei -20 °C gelagert und konnten mehrmals wiederverwendet werden. Die Halbwertszeit betrug 14 Tage.

Beide Sonden-Typen wurden kurz vor der Hybridisierung erneut für 15 min in einem Wasserbad bei 95 °C denaturiert und nach einer kurzen Abkühlungsphase direkt auf die jeweilige Membran zur Hybridisierung gegeben.

5.5 Analyse von DNA

5.5.1 Sequenzierung von DNA [modifiziert nach Sanger et al. (1977)]

Zur Überprüfung der korrekten Basenabfolge von DNA-Fragmenten wurden 600 ng Plasmid-DNA mit 20 pmol Oligonukleotid in 7 µl Gesamtvolumen angesetzt und durch die Firma SEQLAB nach der Kettenabbruchmethode sequenziert. Die erhaltenen Elektropherogramme wurden mit Hilfe der Software „4Peaks“ analysiert.

5.5.2 Nachweis von DNA: Southern Analyse (Southern, 1975)

Um die erfolgreiche Deletion von Genen zu verifizieren, wurden die resultierenden Stämme einer Southern-Analyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die genomische DNA isoliert (siehe Kapitel 5.3.3) und 15 µl dieser Präparation mit einem entsprechenden Restriktionsenzym für 12 h bei 37 °C verdaut. Der komplette Restriktionsansatz wurde anschließend gelelektrophoretisch für 30 min bei 130 V und entsprechend angepasster Stromstärke aufgetrennt. Es folgten mehrere Gelwaschschritte. Dabei wurde das Gel zweimal

für 15 min in 250 mM HCl geschwenkt, um die DNA zu depurinieren, daraufhin kurz mit Wasser gewaschen, für 30 min in 500 mM NaOH mit 1 M NaCl denaturiert und schließlich zweimal 30 min in 1 M NH₄Ac mit 20 mM NaOH neutralisiert.

5.5.2.1 Transfer, Hybridisierung und Detektion von DNA

Die Gesamt-DNA wurde aus dem vorbehandelten Agarosegel mit Hilfe eines Trockenblots über Nacht auf eine positiv geladene „Roti[®]-Nylon Plus“-Membran transferiert. Dabei setzte sich der Blot von unten nach oben aus den folgenden Komponenten zusammen: kopfstehendes Agarosegel, Nylonmembran, zwei Lagen Whatmanpapier, Papierhandtücher und ein ca. 1 kg schweres Gewicht. Am darauffolgenden Morgen wurde die DNA mit UV-Licht (zweimal 12.000 µJ/cm²) in einem „Stratalinker[®] UV Crosslinker 1800“ fixiert.

Im Anschluss wurde die Membran zunächst in 40 ml Southern-Hybpufer bei 65 °C für 2 h prähybridisiert und daraufhin für mindestens 7 h oder über Nacht bei ebenfalls 65 °C mit der entsprechenden DIG-markierten, frisch aufgekochten DNA-Sonde hybridisiert (siehe Kapitel 5.4.8). Es folgten zwei Waschschrte mit 50 ml Southern-Waschpufer für jeweils 20 min bei 65 °C, 5 min Inkubation in DIG-Waschpufer bei 25 °C sowie 1,5 h in 40 ml Blockierungslösung DIG2 bei 25 °C. Die Membran wurde daraufhin in 10 ml Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-Antikörper für 5 min bei 13.000 min⁻¹ zentrifugiert, 1:10.000 verdünnt in DIG2) für 1 h geschwenkt, zweimal 15 min mit 50 ml DIG-Waschpufer gespült, für 5 min mit 40 ml DIG3 äquibriert und schließlich für 5 min in 10 ml aufgetauter „CDP-Star“-Lösung inkubiert. Die so behandelte Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Detektion der DIG-markierten Sonde erfolgte durch Exposition der Nylonmembran für wenige Sekunden bis zu 30 min auf einem „Amersham HyperfilmTM ECL, RPN1674“ in der Dunkelkammer und anschließender Entwicklung in einem „Medical Film Professor SRX-101A“ oder in einer „Chemostar Professional Apparatur“ unter Verwendung der „ChemoStar Imager Software“.

5.6 Analyse von RNA

5.6.1 Nachweis von RNA: Northern-Analyse

5.6.1.1 Isolation von RNA aus *S. cerevisiae* (Cross and Tinkelenberg, 1991)

Die Hauptkultur der verwendeten Hefestämme wurde in 30 ml YNB-Medium mit entsprechenden Supplementen bei 30 °C von einer OD₆₀₀ von 0,25 bis 1 (logarithmische

Phase) angezogen. Davon wurden 25 ml bei 4.000 min^{-1} für 3 min geerntet und das Zellpellet mit 1 ml kaltem TE-Puffer in ein frisches 2,2 ml „Safelock“-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min bei 6.000 min^{-1}) wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Extraktion der RNA wurde das auf Eis aufgetaute Pellet mit 400 μl „Cross“-RNA-Puffer I, 400 μl „Roti® Aqua Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur DNA/RNA-Isolierung“ (Verhältnis 25:24:1) sowie 600 mg Glasperlen (\varnothing 0,25 bis 0,5 mm) versetzt und die Zellen bei 4°C für 10 min auf einem „Vibrax Basic“ aufgebrochen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt, um das RNA-Degradationsrisiko zu minimieren. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 min^{-1} , um die Zelltrümmer und denaturierten Proteine von der wässrigen, oberen RNA-Phase zu trennen. Der komplette Überstand wurde in 1 ml eiskaltem 100%igen (v/v) Ethanol bei -70°C für 15 min gefällt und der Ansatz erneut für 10 min bei 13.000 min^{-1} pelletiert. Das RNA-Pellet wurde schließlich für 15 min luftgetrocknet und in 30 μl „Cross“-RNA-Puffer II resuspendiert. Die Konzentration und Qualität der erhaltenen RNA-Lösung wurde mit Hilfe des „Nano Drop® ND Spectrophotometers“ bestimmt. Dabei zeigte ein 260/280 nm Verhältnis von 1,8 bis 2,2 eine hohe Reinheit der extrahierten RNA an.

5.6.1.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese [modifiziert nach McMaster und Carmichael (1977)]

Die Auftrennung der RNA-Fragmente nach Größe erfolgte in einem 1,4%igen (w/v) Agarosegel (2,1 g Agarose in 135 ml Wasser und 15 ml $1\times$ MOPS-Puffer) mit $1\times$ MOPS-Puffer als verwendeten Laufpuffer. Pro Spur wurden 17 μg RNA mit 2,4 μl $10\times$ MOPS-Puffer, 2,4 μl 8 M Glyoxal, 12 μl DMSO und 4 μl RNA-Ladepuffer in einem Gesamtvolumen von 30 μl aufgetragen. Dieses Gemisch wurde zunächst für 15 min bei 65°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und schließlich auf das Agarosegel geladen. Die Elektrophorese wurde für 2,5 h bei 80 V und automatisch angepasster Stromstärke durchgeführt. Nach ca. 1,5 h wurde der MOPS-Laufpuffer kurz durchmischt, um einen zu hohen Ionengradienten innerhalb des Laufpuffers zu vermeiden.

5.6.1.3 Transfer, Hybridisierung und Detektion von RNA

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe eines Kapillarblots über Nacht auf eine neutrale „Hybond-N Nylonmembran“ transferiert. Zu diesem Zweck wurde das Agarosegel zunächst mit Wasser gewaschen und die Taschen entfernt. Der Kapillarblot setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (von unten nach oben):

Wanne mit 10× SSC-Puffer, umgedrehter Gelschlitten, Whatmanpapier als Brücke zum Pufferreservoir, Nylonmembran, kopfstehendes Agarosegel, zwei Whatmanpapiere, Papierhandtücher, 1 kg Gewicht. Daraufhin wurde die Membran luftgetrocknet und die RNA durch UV-Bestrahlung (zweimal 12.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) in einem „Stratalinker® UV Crosslinker 1800“ fixiert. Zur Überprüfung der Qualität der extrahierten RNA sowie des Transfererfolges wurden die beiden 28S und 18S rRNA-Banden durch 10-minütige Inkubation in einer Methylenblaulösung und anschließender Entfärbung mit Wasser sichtbar gemacht. Dabei deutete ein Schmier innerhalb einer Spur auf eine hohe Degradation der RNA hin, während das Vorkommen von zwei distinkten Banden auf eine gute Qualität der Gesamt-RNA schließen ließ.

Die Detektion der zu untersuchenden mRNA erfolgte entweder mit DIG- oder radioaktiv markierten DNA-Sonden. Im Fall der immunochemischen Detektion mit Hilfe des DIG-Systems entspricht der weitere Ablauf des Experimentes den in Kapitel 5.5.2.1 beschriebenen Schritten. Um die gleichzeitige Detektion der zu untersuchenden und der *ACT1*-mRNA (Ladekontrolle) zu ermöglichen, wurde die Membran nach mindestens siebenständiger Inkubation mit der ersten Sonde, zunächst für 2 h mit 40 ml Southern-Hybpuffer gewaschen und daraufhin mit der zweiten, frisch denaturierten Sonde für weitere 7 h oder über Nacht hybridisiert.

Alternativ zum DIG-System wurden ebenfalls radioaktiv markierte DNA-Sonden eingesetzt, um die Sensitivität der Northern-Analyse zu steigern und gering exprimierte Transkripte zu detektieren. Zu diesem Zweck wurde die Nylonmembran nach der Methylenblaufärbung zunächst für 2 h in 50 ml Northern-Hybpuffer bei 65 °C prähybridisiert, für 2 h mit der frisch denaturierten, radioaktiv markierten DNA-Sonde bei ebenfalls 65 °C hybridisiert und anschließend dreimal 20 min mit 40 ml Northern-Waschpuffer bei 65 °C inkubiert. Die luftgetrocknete Membran wurde in einen Plastikbeutel eingeschweißt, je nach Intensität des Signals für 30 min bis zu 14 d in einer „Storage Phosphor Cassette“ exponiert und mit Hilfe des „Storm860 Phosphoimagers“ ausgelesen. Zur Detektion eines zweiten Transkriptes wie der *ACT1*-mRNA (Ladekontrolle) wurde die erste Sonde nach erfolgter Detektion durch dreimalige Inkubation mit 40 ml Northern-Stripping-Puffer bei 80 °C entfernt, die Nylonmembran erneut für 2 h mit 50 ml Northern-Hybpuffer bei 65 °C prähybridisiert und anschließend mit der frisch denaturierten zweiten Sonde für 1 h bei 65 °C hybridisiert. Die weitere Analyse erfolgte analog zur Detektion des ersten Transkriptes. Die detektierten Signale wurde unter Verwendung des Programms „LabImage 1D“ quantifiziert.

5.6.2 Globale Transkriptanalyse: „Microarray“

Die globale Transkriptanalyse wurde pro *S. cerevisiae* Stamm mit zwei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Hefestämme zunächst in einer 35 ml YNB-Hauptkultur mit 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil von $OD_{600} = 0,25$ bis $OD_{600} = 1$ (logarithmische Phase) angezogen und je 30 OD für die RNA-Isolation durch Zentrifugation geerntet (3 min bei 4.000 min^{-1}).

5.6.2.1 Isolation von RNA aus *S. cerevisiae* mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kits“

Um eine höchst mögliche Reinheit und geringe Degradierungsrate der RNA zu gewährleisten wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des „RNeasy® Mini Kits“ nach dem Protokoll „Purification of total RNA from yeast – 1c Mechanical disruption of cells“ entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Dabei wurden die Zellen zunächst durch 10-minütige Inkubation mit 600 mg Glasperlen (\varnothing 0,25 bis 0,5 mm) und 600 μl RLT-Puffer auf einem „Vibrax Basic“ bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgebrochen, die Gesamt-RNA über eine Säulenmatrix aufgereinigt und schließlich mit 50 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA-Lösung wurde mit Hilfe des „Nano Drop® ND Spectrophotometers“ bestimmt. Die Extrakte der hier verwendeten Stämme und Replikate wiesen eine RNA-Konzentration von ca. 170 bis 220 $\text{ng}/\mu\text{l}$ mit einem 260/280 nm-Verhältnis von ca. 2,2 auf. Des Weiteren wurde die Qualität der isolierten Gesamt-RNA in einer Kapillargelelektrophorese unter Verwendung des „Bioanalyzers 2100“ und „Agilent RNA6000 Nano Kits“ überprüft. Bis zur weiteren Aufbereitung wurden die RNA-Lösungen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Alle nachfolgenden Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. auf Eis durchgeführt.

5.6.2.2 Aufbereitung der RNA mit Hilfe des „GeneChip® 3'IVT Express Kits“

cDNA-Synthese

Zur Amplifikation von cDNA wurden je 250 ng extrahierte RNA für die Erststrang-Synthese verwendet und mit 2 μl verdünnter Poly-A RNA-Kontrolllösung in einem Gesamtvolumen von 5 μl versetzt. Nach der Zugabe von 5 μl „First-Strand Master Mix“ (4 μl „First-Strand Buffer Mix“ und 1 μl „First-Strand Enzyme Mix“) erfolgte die Erststrang-Synthese mit Hilfe von T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden für 2 h bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 20 μl „Second-Strand Master Mix“ (13 μl Nuklease-freies Wasser, 5 μl „Second-Strand Buffer Mix“ und 2 μl „Second-Strand Enzyme Mix“) versetzt, durchmischt, für 1 h bei $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Zweitstrang-Synthese inkubiert und einer 10-minütigen Hitzeinaktivierung bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ unterzogen. Dabei wurde gleichzeitig die noch vorhandene rRNA degradiert.

In-vitro Transkription und Fragmentierung zur Herstellung von Biotin-markierter aRNA

Die *in vitro* Transkription der cDNA wurde nach der Zugabe von 30 µl „IVT Master Mix“ (4 µl „IVT Biotin Label“, 20 µl „IVT Labeling Buffer“ und 6 µl „IVT Enzyme Mix“) für 16 h bei 40 °C durchgeführt und resultierte schließlich in der Generierung von Biotin-markierter amplifizierter RNA (aRNA). Zur Entfernung von Enzymen, Salzen und nicht-inkorporierten Nukleotiden wurde die aRNA daraufhin über eine RNA-bindende, magnetische Matrix aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurden die aRNA-Ansätze zusammen mit 60 µl „aRNA Binding Mix“ (10 µl „RNA-Binding Beads“ und 50 µl „aRNA Binding Buffer Concentrate“) in eine 96er Mikrotiterplatte gegeben, mit 120 µl 100%igem (v/v) Ethanol versetzt und für 2 min unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit je 100 µl „aRNA Wash Solution“ wurde der Überstand entfernt und die Matrix für eine weitere Minute geschüttelt, um Ethanolreste zu entfernen. Die Elution der aRNA erfolgte durch dreiminütige Inkubation der Matrix mit 50 µl vorgewärmter „aRNA Elution Solution“. Daraufhin wurde sowohl der Erfolg der *in vitro* Transkription als auch der rRNA-Degradation in einer Kapillarelektrophorese mit Hilfe des „Bioanalyzers 2100“ und „Agilent RNA6000 Nano Kits“ verifiziert. Zu diesem Zweck wurde 1 µl aRNA eingesetzt. Die Fragmentierung der aRNA erfolgte schließlich unter Verwendung von 7,5 µg aRNA mit 4 µl „5× Array Fragmentation Buffer“ in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 35 min bei 94 °C.

„Array“-Hybridisierung und -Detektion

Für die globale Transkriptanalyse wurde ein „Affimetrix GeneChip® Yeast Genome 2.0 expression Array“ (169er Format Mini) sowie die „Affimetrix GeneChip® Operating Software“ verwendet. Der Minichip wurde zunächst mit 80 µl Prähybridisierungspuffer für 10 min bei 45 °C in einer „Affimetrix Fluidics 450 Station“ bei 60 min⁻¹ äquilibriert. Während dessen wurde pro Stamm und Replikat ein Hybridisierungscocktail mit einem Gesamtvolumen von 100 µl und folgenden Komponenten angesetzt.

5 µg	fragmentierte, biotinylierte aRNA
1,7 µl	Kontroll-Oligonukleotid B2 (3 nM)
5 µl	20× Hybridisierungskontrollen (bioB, bioC, bioD, cre)
50 µl	2× Hybridisierungs-Mix
10 µl	DMSO
bis 100 µl	Nuklease-freies Wasser

Dieser Ansatz wurde zunächst für 5 min bei 99 °C denaturiert, weitere 5 min bei 45 °C inkubiert und einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 min⁻¹ unterzogen. Schließlich wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen, 80 µl Hybridisierungscocktail in den Minichip pipettiert und der Minichip über Nacht bei 45 °C und 60 min⁻¹ hybridisiert. Am

darauffolgenden Tag wurde der Hybridisierungscocktail entnommen, der Minichip mit 80 µl „Holding Buffer“ versetzt und verschiedenen Wasch- und Färbeschritten analog zum Protokoll „Mini_euk2v3_450“ der AFFIMETRIX GmbH unterzogen. Dabei wurde die biotinylierte aRNA schließlich mit Hilfe von Streptavidin-Phycoerythrin, aus der Ziege stammenden IgG-Antikörpern, biotinylierten Antikörpern und entsprechenden Färbepuffern detektiert. Die Signalintensitäten des Minichips wurden mit Hilfe des „GeneChip® Scanners 3.000“ und dem Programm „GeneChip® Command Console“ aufgezeichnet und als nicht-skalierte Roh-Datei (.cel) gespeichert. Nach der Normalisierung dieser Dateien mit der „GeneChip® Command Console“ wurden die Expressionsdaten mit Hilfe des Programms „Microsoft Excel“ weiter verarbeitet. Dabei wurden die auf dem Minichip befindlichen Gene unter Verwendung der Datei „Yeast_Annotation_Sc“ der AFFIMETRIX GmbH mit den Gen-Identifikationsnummern aus *S. cerevisiae* abgeglichen und Referenzgene aus anderen Organismen entfernt. Von jeweils zwei Replikaten wurden Durchschnittswerte errechnet und die x-fache Änderung der Genexpression zwischen verschiedenen Stämmen sowie der p-Wert für eine solche Änderung bestimmt. Per Definition wurden solche Gene als signifikant differentiell exprimiert bezeichnet, deren absolute Durchschnittswerte eine minimale Differenz von 15 und eine mindestens 1,99-fache Änderung aufwiesen. Darüber hinaus wurden Venn-Diagramme mit Hilfe eines Internet-basierten Programms (Hulsen et al., 2008) erstellt, um die von zwei verschiedenen Stämmen gemeinsam regulierten Gene zu erfassen. Der Repräsentationsfaktor (RF) gibt die Anzahl von koregulierten Genen bei zufälliger Probennahme an, während der p-Wert die Wahrscheinlichkeit für eine solche Koregulation berechnet (http://elegans.uky.edu/MA/progs/overlap_stats.html). Die Daten dieser globalen Transkriptanalyse sind in der „ArrayExpress-Datenbank“ (www.ebi.ac.uk) unter der Zugangsnummer E-MEXP-3610 hinterlegt.

5.7 Analyse von Proteinen

5.7.1 Photometrischer β -Galaktosidase-Test (Rose and Botstein, 1983)

5.7.1.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für den photometrischen β -Galaktosidase-Test

Es wurden 5 ml einer YNB-Hauptkultur mit entsprechenden Supplementen für 5 min bei 3.000 min⁻¹ zentrifugiert und das resultierende Pellet mit 3 ml Aufschlusspuffer ohne DTT

gewaschen. Die Zellen wurden mit 250 µl Aufschlusspuffer in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und entweder bei -20 °C zur späteren Verwendung gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Der Ansatz wurde anschließend mit 500 µg Glasperlen (ø 0,25 bis 0,5 mm) und 12 µl PMSF-Lösung versetzt und der Zellaufschluss durch 10-minütige Inkubation auf einem „Vibrax Basic“ bei 4 °C durchgeführt. Nach der Zugabe von weiteren 250 µl Aufschlusspuffer mit DTT und einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 min⁻¹ wurden 10 µl dieses Extraktes zur Konzentrationsbestimmung nach Bradford sowie für den eigentlichen β-Galaktosidasetest verwendet.

5.7.1.2 Photometrischer β-Galaktosidasetest

Zur Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität wurden je 10 µl des Proteinextraktes mit 200 µl Z-Puffer in je 2 Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte gegeben (Doppelbestimmung) und für 5 min bei 28 °C inkubiert. Die Umsetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 27 µl ONPG-Lösung gestartet. Die Ansätze wurden so lange bei 28 °C kultiviert bis eine deutliche Gelbfärbung zu erkennen war und die Reaktion mit 67 µl 1 M Na₂CO₃ abgestoppt wurde. Die Dauer dieser Umsetzung wurde für die spätere Bestimmung der spezifischen Aktivität festgehalten und die Extinktion der einzelnen Proben mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegeräts „Model 680 Microplate Reader“ bei 420 nm bestimmt. Darüber hinaus wurde die Konzentration des Proteinextraktes nach Bradford ermittelt. Zu diesem Zweck wurden 10 µl des Proteinextraktes mit 300 µl 1:5 verdünnter Bradfordlösung versetzt und die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Um aus diesen Werten die jeweiligen Proteinkonzentrationen zu ermitteln, wurden ferner je 10 µl verschieden konzentrierte BSA-Lösungen (0,1 bis 1,6 mg/ml in Aufschlusspuffer) mit Hilfe der Bradford-Analyse untersucht und eine Eichkurve erstellt. Schließlich wurde die spezifische Aktivität der einzelnen Proteinextrakte unter Verwendung folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{E_{420} \times V_{\text{Reaktion}}}{E_{420(1\text{nM/ml ONPG-Lsg.})} \times V_{\text{Extrakt}} \times c_{\text{Extrakt}} \times \Delta t}$$

E_{420}	= Extinktion bei 420 nm
V_{Reaktion}	= Volumen des Reaktionsansatzes (ml)
$E_{420(1\text{nM/ml ONPG-Lsg.})}$	= Extinktion einer 1nM/ml ONPG-Lösung (0,0045)
V_{Extrakt}	= Volumen des eingesetzten Proteinextraktes (ml)
c_{Extrakt}	= Konzentration des eingesetzten Proteinextraktes (mg/ml)
Δt	= Dauer der Reaktion (min)

Die spezifische Aktivität wird in nM/mg/min angegeben.

5.7.2 Nachweis von Proteinen: Western-Analyse

5.7.2.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für die immunochemische Detektion [modifiziert nach Riezmann et al. (1983)]

Die Hauptkulturen wurden von $OD_{600} = 0,25$ bis $OD_{600} = 1$ (logarithmische Phase) in 10 ml YNB-Medium mit entsprechenden Supplementen bei 30 °C angezogen und 1,5 OD durch zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 min^{-1} geerntet. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Das Zellpellet wurde in 1 ml kaltem Wasser resuspendiert und mit 150 μl Lyselösung versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden dem Ansatz 150 μl 50% (w/v) TCA zur Neutralisation hinzugefügt, dieser für weitere 10 min inkubiert und die denaturierten Proteine schließlich durch Zentrifugation (10 min bei 13.000 min^{-1}) pelletiert. Die Gesamtproteine wurden anschließend in 50 μl Harnstoffpuffer resuspendiert und bei 37 °C für 15 min erwärmt. Die Proteinextrakte wurden entweder bei -20 °C gelagert oder nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 min^{-1} direkt in eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford war nicht möglich.

5.7.2.2 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse wurden SDS-Polyacrylamidgele mit 3%igem Sammel- und 10%igem Trenngel verwendet (Tab. 16).

Tab. 16: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels (SDS-PAGE)

Sammelgel (3% Acrylamid)	Trenngel (10% Acrylamid)
1,5 ml „Upper Tris“, pH 6,8 (4×)	2,5 ml „Lower Tris“, pH 8,8 (4×)
600 μl 30% (v/v) Acrylamid	4 ml 30% (v/v) Acrylamid
40 μl 10% (w/v) APS	25 μl 10% (w/v) APS
20 μl TEMED	15 μl TEMED
3,9 ml Wasser	3,5 ml Wasser

Die denaturierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese erfolgte in „Mini-PROTEAN® 3“-Kammern mit 1× Elektrophoresepuffer. Dazu wurden pro Spur 12 μl Gesamtproteinextrakt aufgetragen und 6,5 μl „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ als Größenstandard verwendet. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V für 15 min angelegt, um den sanften Eintritt der Proteine in die Polyacrylamidgele zu ermöglichen. Anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht und die Gelelektrophorese für weitere 45 min fortgeführt bis die blaue Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte.

5.7.2.3 Immunochemische Detektion von Proteinen (Towbin et al., 1979)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden anschließend in einem Elektrobplot mit $1\times$ Transferpuffer auf eine „Protran[®] Nitrocellulosemembran“ über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ transferiert. Zu diesem Zweck wurde eine „Mini Transfer Electrophoretic Transfer Cell“-Kammer verwendet. Um den erfolgreichen Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Nitrocellulosemembran im Anschluss für 5 min in einer Ponceaulösung geschwenkt und durch mehrmalige Waschschrte mit Wasser entfärbt. Die auf diese Weise angefärbten Gesamtproteine wurden fotografisch festgehalten. Die restliche Ponceaulösung wurde durch dreifache Inkubation in $1\times$ TBS entfernt.

Die Nitrocellulosemembran wurde daraufhin in TBS-Puffer mit 4% (w/v) Magermilchpulver für 45 min geschwenkt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tab. 6) erfolgte für 1 bis 3 h oder über Nacht in TBS-T-Puffer mit 4% (w/v) Magermilchpulver in einem 50 ml Reaktionsgefäß auf dem Rollinkubator „SRT6-Roller“. Nach einem achtminütigen Waschschrte in TBS-T-Puffer und zwei weiteren in TBS-T-Puffer mit 4% (w/v) Magermilchpulver für je 8 min wurde die Membran für 1 bis 2,5 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 7) in TBS-T-Puffer mit 4% (w/v) Magermilchpulver rollend inkubiert und erneut den drei oben beschriebenen Waschschrten unterzogen. Entsprechend den Herstellerangaben wurden manche Antikörper mit 3% statt 4% (w/v) Magermilchpulver behandelt (anti-Tubulin) oder es wurde auf die Verwendung von Tween verzichtet (anti-myc). Die Antikörper-markierten Proteine wurden mit Hilfe der ECL-Methode detektiert (Tesfaigzi et al., 1994). Zu diesem Zweck wurde die Nitrocellulosemembran mit je 10 ml ECL-Lösung I und II für 1 min inkubiert und mit einer Plastikfolie abgedeckt. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Einerseits wurde die Membran auf einem „Amersham HyperfilmTM ECL, RPN1674“ in der Dunkelkammer je nach Signalintensität für 3 sec bis 20 min exponiert, der ECL-Film mit einem „Medical Film Professor SRX-101A“ entwickelt und anschließend mit einem „Epson Perfection 4990 Photo“ gescannt, um die Quantifizierung mit dem Programm „LabImage 1D“ zu ermöglichen. Alternativ wurde die Chemilumineszenz der ECL-Membran mit Hilfe der „Chemostar Professional Apparatur“ unter Verwendung der „ChemoStar Imager Software“ für 5 bis 30 min detektiert. Die Quantifizierung der Signale wurde ebenfalls mit Hilfe des Programms „LabImage 1D“ durchgeführt. Um ein weiteres Protein immunochemisch zu detektieren, wurden die bereits gebundenen Antikörper durch dreimalige 15-minütige Inkubation in 3%iger (w/v) TCA-Lösung bei Raumtemperatur entfernt. Die

Nitrozellulosemembran wurde dreimal 5 min in TBS-Puffer zur Neutralisation geschwenkt und erneut in TBS-T-Puffer mit 4% (w/v) Magermilchpulver abgesättigt. Alle nachfolgenden Schritte der Antikörperinkubation und immunochemischen Detektion wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

5.7.3 „Crosslinking Immunopräzipitations-Analyse“ von RBP-mRNA-Komplexen [CLIP, modifiziert nach Jensen und Darnell (2008)]

Zur Identifikation von Whi3-gebundenen Transkripten, sollte zunächst das TAP-markierte Whi3 über zwei verschiedene Aufreinigungsschritte aus *S. cerevisiae* isoliert werden. Da Whi3 jedoch aufgrund seiner Funktion als dosisabhängiger Zellzyklusregulator nicht überexprimiert werden kann ohne einen G1-Arrest hervorzurufen, wurde ein Hefestamm mit genomisch TAP-markiertem *WHI3* verwendet (YHUM1628) und *WHI3* unter nativen Bedingungen exprimiert. Die Anzucht des *WHI3*-TAP-Stamms erfolgte in 0,5 bzw. 3 l YEPD-Medium oder alternativ in 1 bzw. 3 l YNB-Medium mit 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil bei 30 °C auf einem Drehschüttler von OD₆₀₀ = 0,25 bis OD₆₀₀ = 2. Die Zellen wurden zunächst durch direkte Zugabe von Eis für 5 min gekühlt, bei 6.000 min⁻¹ und 4 °C für 10 min in einer „Sorvall RC-5B Plus Superspeed“ Zentrifuge pelletiert und mit 200 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Nach einem erneuten Waschschrift mit 25 ml eiskaltem Wasser wurden die Zellen schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufreinigung bei -70 °C gelagert.

5.7.3.1 Herstellung eines nativen Zellextraktes im Rahmen der CLIP

Das gefrorene Zellpellet wurde in einfachem Volumen Puffer A auf Eis resuspendiert und 15 µl Probe für eine spätere Western-Analyse entnommen. Diese wurden nach einem 15-sekündigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 min⁻¹ mit 7,5 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und bei -70 °C zwischengelagert. Alternativ wurde der Aufbruchpuffer A mit 1% (v/v) Triton X-100 versetzt. Die restlichen Zellen wurden unter Verwendung einer „SLM Aminco French Press“ aufgebrochen, indem die Hefesuspension drei- bis fünfmal bei 1.200 psi durch eine schmale Öffnung gepresst wurde. Der Zellextrakt wurde durch Zugabe einer 2 M KCl-Lösung auf 0,2 M KCl eingestellt und zunächst für 25 min bei 15.000 min⁻¹ und 4 °C in einer „Beckman LK7-65 Ultracentrifuge“ mit dem 80Ti-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde anschließend erneut für 45 min bei 33.000 min⁻¹ zentrifugiert. Die mittlere Protein-haltige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl und 0,1% (w/v) Nonidet P-40

eingestellt. Nach der Entnahme und Verarbeitung einer weiteren Westernprobe wurde der Zellextrakt für die Aufreinigung über eine Affinitätsmatrix verwendet. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

In einer alternativen Aufbruchmethode wurden die tiefgefrorenen Zellen erneut mit flüssigem Stickstoff versehen und unter Verwendung der Kugelmühle „MM200“ bei 30 Hz für 15 min geöffnet. Der Extrakt wurde bei 4 °C aufgetaut und 20 min bei 22.000 min⁻¹ in einer „Beckman LK7-65 Ultracentrifuge“ pelletiert. Der Überstand wurde für die weitere Aufreinigung von Whi3-TAP verwendet.

5.7.3.2 Aufreinigung von TAP-markiertem Whi3

In einem ersten Aufreinigungsschritt wurden 150 µl einer „Rabbit-IgG-Sepharose“-Matrix verwendet. Diese wurde zunächst bei 8.000 min⁻¹ anzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Matrix mit 500 µl IPP150-Puffer äquilibriert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und der Zellextrakt, der u. U. erneut mit Proteaseinhibitoren versetzt worden war, für 0,5 bis 1,5 h mit der Sepharose-Matrix rollend inkubiert, um die Bindung von Whi3-TAP an die Matrix zu gewährleisten. Ferner wurde eine 100 µl Probe für die spätere Western-Analyse entnommen. Im Anschluss wurde die Matrix je dreimal mit 1 ml IPP150-Puffer bzw. 1 ml TEV-CB-Puffer gewaschen und in 150 µl TEV-CB-Puffer resuspendiert. Die Elution von Whi3-CBP erfolgte durch Verdau mit 70 U AcTEVTM-Protease für ein oder drei Stunden oder über Nacht auf einem Rollinkubator. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, erneut zentrifugiert, eine Probe für die spätere Western-Analyse entnommen und der Überstand für den zweiten Aufreinigungsschritt über eine Calmodulin-Matrix verwendet. Zu diesem Zweck wurden 50 µl Matrix zunächst mit 500 µl CBP-Puffer äquilibriert und anschließend für 1,5 bis 3,5 h mit dem Whi3-CBP-Überstand und dem 3,6-fachen Volumen CBP-Puffer rollend inkubiert. Es wurde eine weitere Probe für die spätere Western-Analyse entnommen. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit 1 ml CBP-Puffer gewaschen und nach Entfernung des Überstandes für 5 min mit 80 µl Lämmli-Puffer bei 95 °C gekocht, um Whi3-CBP von der Matrix zu eluieren.

5.8 Untersuchung von *S. cerevisiae*

5.8.1 Adhäsionstest an Agarplatten: Waschtest (Roberts and Fink, 1994)

Um die Adhäsionsfähigkeit verschiedener *S. cerevisiae* Stämme an Agaroberflächen zu testen, wurden die jeweiligen Stämme auf festem YEPD-Medium oder SC-Medium mit entsprechenden Supplementen für drei bis fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden nicht-adhärenente Zellen durch einen leichten bis stringenten Wasserstrahl abgewaschen. Die Platten wurden vor (totales Wachstum) und nach (adhäsives Wachstum) diesem Waschschrift mit einer „Canon PowerShot A620“ Digitalkamera fotografiert.

5.8.2 Tropftest zur Bestimmung der Sensitivität von *S. cerevisiae* gegenüber verschiedenen Stressbedingungen

Die zu untersuchenden Stämme wurden zunächst in einer YEPD-Hauptkultur von $OD_{600} = 0,25$ bis $OD_{600} = 0,8$ bei 30 °C angezogen und anschließend seriell verdünnt. Je 3 μ l dieser Verdünnungen (unverdünnt, 5 \times , 25 \times , 125 \times , 625 \times) wurden auf festes YEPD-Medium ohne oder mit Additiva getropft und für 2 d bei 30 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Inhibitoren der Translationselongation wurde den YEPD-Platten 3 μ g/ml Cycloheximid, 20 μ g/ml Geneticin oder 65 μ g/ml Hygromycin B zugesetzt. Die Resistenz gegenüber Zellwandstress wurde durch Zugabe von 5 μ g/ml „Calcofluor White“ ermittelt. Darüber hinaus wurden die Stämme einem kontinuierlichen Hitzestress durch Wachstum bei 37 °C statt 30 °C für 2 d ausgesetzt. Ferner wurde der Effekt eines Hitzeschocks bei 42 °C bzw. 50 °C auf das Zellwachstum untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach Erreichen der logarithmischen Phase zunächst bei 38 °C für 30 min vorinkubiert und anschließend einem 10-minütigen Hitzeschock bei 42 °C oder 50 °C ausgesetzt. Anschließend wurden erneut serielle Verdünnungen hergestellt, je 3 μ l auf festes YEPD-Medium getropft und diese für 2 d bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum unter Kontroll- und Stressbedingungen wurde fotografisch mit einer „Canon PowerShot A620“ Digitalkamera festgehalten.

5.8.3 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lokalisation und Signalintensität von GFP- oder RFP-markierten Proteinen zu bestimmen, wurden die jeweiligen Hefestämme in LFM-Medium mit entsprechenden Supplementen von $OD_{600} = 0,25$ bis $OD_{600} = 1$ (logarithmische Phase) angezogen und je 3 μ l

auf einen mit 1% (w/v) Agarose beschichteten Objektträger getropft. Die Zellen wurden anschließend mit dem Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“ und der „Velocity 3D Imaging Software“ untersucht und mit Hilfe einer „ORCA-ERA CCD-Kamera“ fotografiert. Dabei wurde ein 63× Plan Apochromat Öl Objektiv (NA 1,4) verwendet und die Zellen sowohl mit Differentialinterferenzkontrast (DIC) als auch fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung des GFP- (Anregung bei 488 nm, Emission bei 509 nm) bzw. RFP- (Anregung bei 551 nm, Emission 573 nm) Filterwürfels analysiert. Die jeweilige Expositionszeit richtete sich nach der Signalintensität und schwankte zwischen 100 und 400 msec. Die Bildbearbeitung und Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software „ImageJ“ (Schneider et al., 2012). Neben Einzelbildern wurden ebenfalls Stapel mit dem „Improvision Piezo Focus Drive“ aufgenommen, die in 0,3 µm Schritten insgesamt 21 Ebenen einer Zelle darstellen. Aus diesen Stapeln wurden schließlich fünf fokussierte, aufeinanderfolgende Einzelbilder ausgewählt und mit Hilfe des Programms ImageJ in einem Bild mit maximaler Intensität übereinander gelagert.

5.8.4 Bestimmung des Ploidiegehalts mittels „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS, modifiziert nach Ule [2005])

Wachstumsbedingungen und Probenvorbereitung

Um die Genomduplikationsrate von *S. cerevisiae* Stämmen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen zu bestimmen, wurden die Stämme zunächst in flüssigem oder auf festem YEPD- oder YNB-Medium mit entsprechenden Supplementen bis zu 72 d kultiviert. Alle zwei Tage wurden die Stämme in bzw. auf frisches Medium passagiert und zu angegebenen Zeitpunkten der DNA-Gehalt mit Hilfe der FACS-Analyse ermittelt. Zu diesem Zweck wurde etwas Zellmaterial von den YNB- bzw. YEPD-Platten entnommen und in 10 ml flüssigem YNB-Medium mit entsprechenden Supplementen auf eine OD₆₀₀ von 0,25 inokuliert. Nach Erreichen der logarithmischen Phase (OD₆₀₀ = 1) wurden die Zellen durch dreiminütige Zentrifugation bei 2.000 min⁻¹ pelletiert. Analog dazu wurden die in flüssigem Medium kultivierten Stämme zu den gleichen Zeitpunkten ebenfalls von OD₆₀₀ = 0,25 bis OD₆₀₀ = 1 kultiviert und geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend mit 3 ml 1× PBS-Puffer gewaschen, mit 5 ml 15%igem (v/v) Glycerin versetzt und bis zur FACS-Analyse bei -70 °C gelagert. Die bei Raumtemperatur aufgetauten Zellen wurden erneut mit 3 ml 1× PBS-Puffer gewaschen, in 5 ml 1× PBS-Puffer resuspendiert und mit Hilfe des Ultraschall-Homogenisators “Sonopuls HD 3100” bei 4 °C sonifiziert, um die einzelnen Zellen

voneinander zu separieren: Dabei wurden insgesamt 25 Zyklen mit einem 30%igen Puls für 15 sec, gefolgt von 45 sec Pause durchlaufen. Die erfolgreiche Separation wurde lichtmikroskopisch in einem „Axio Imager A1“ mit einem 63× Plan Apochromat Öl Objektiv (NA 1,25) überprüft. Nach einem erneuten Zentrifugations- und Waschschrift mit 3 ml Natriumcitratpuffer, wurden die Zellen schließlich über Nacht bei 37 °C mit 25 µl 0,25 mg/ml RNase A verdaut. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen erneut gewaschen, für 1 h bei 50 °C in 1 ml Natriumcitratpuffer mit 20 µl Proteinase K behandelt und schließlich nach einem weiteren Waschschrift für 3 h in 1 ml Natriumcitratpuffer mit 1,8 µl einer Propidiumiodidlösung (1,6 mg/ml PI in Wasser) bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Abschließend wurden die Zellen erneut zweimalig mit 1 ml Natriumcitratpuffer gewaschen.

FACS-Analyse

Zur Untersuchung des DNA-Gehaltes wurden pro Stamm 100 µl aufbereitete Zellen mit 400 µl FACS-Puffer verdünnt und mit Hilfe eines „BD-FACS Calibur™ Flow Cytometers“ sowie der „BD CellQuest Pro™ Software“ analysiert (Anregung bei 488 nm, Emission bei 617 nm). Zu diesem Zweck wurden die in Tab. 17 aufgeführten Parameter verwendet. Pro Messung wurden 50.000 Zellen untersucht. Die Daten wurden anschließend unter Verwendung des Programms „FlowJo“ ausgewertet und in Form eines Graphen dargestellt.

Tab. 17: Gewählte Parameter des „BD-FACS Calibur™ Flow Cytometers“ während der FACS-Analyse.

Parameter	Detektor	Spannung	Verstärker	Modus
P1	FSC	E01	5,50	Lin
P2	SSC	416	1,75	Lin
P3	FL1	727	1	Log
P4	FL2	616	1	Log
P5	FL3	801	1	Log
P6	FL2-A	/	1	Lin
P7	FL4	692	/	Log

5.8.5 Bestimmung der Zellgröße

Die Zellgröße verschiedener *S. cerevisiae* Stämme wurde zum einen mit Hilfe eines Partikelanalysators und zum anderen lichtmikroskopisch bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Stämme in flüssigem YNB-Medium mit entsprechenden Supplementen bis zur logarithmischen Phase kultiviert. Für die Messung mit dem Partikelanalysator „Multisizer™ 3 Coulter Counter®“ wurde die Kultur 1:100 in 0,9% (w/v) NaCl verdünnt und pro Stamm 20.000 Zellen mit einer 100 µm breiten Kapillare hinsichtlich ihrer Größe untersucht. Dabei wird nach dem Impedanzverfahren die Widerstandsänderung eines Partikels beim Durchgang durch die Kapillare gemessen und aus diesem Wert das Volumen des

Partikels errechnet. Die Daten wurden anschließend mit der „Multisizer™ 3 Software“ analysiert und die Verteilung der Messwerte in einem Graphen mit logarithmischer x-Achse sowie 7-facher Glättung dargestellt. Die im Ergebnisteil angegebenen Zellgrößen stellen relative Medianwerte aus einem Größenbereich von 20 bis 200 μm^3 dar, die an Hand des Kontrollstamms normalisiert worden sind.

Alternativ wurden je 3 μl der zu untersuchenden Stämme auf einen mit 1%iger (w/v) Agarose beschichteten Objektträger getropft und unter Verwendung des Mikroskops „Axiovert 200M“ und eines 63 \times Plan Apochromat Öl Objektivs (NA 1,4) sowie der „Volocity 3D Imaging Software“ untersucht. Dabei wurde eine „ORCA-ERA CCD-Kamera“ und Differentialinterferenzkontrast (DIC) verwendet. Anschließend wurde die Größe von mindestens 50 Zellen manuell mit dem Programm „ImageJ“ ermittelt und die relativen Medianwerte angegeben.

5.8.6 Bestimmung der Koloniegröße

Um die Koloniegröße von zwei verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen simultan auf einer Agarplatte zu ermitteln, wurden beide Stämme zunächst zu Identifikationszwecken entweder mit einem RFP- (BHUM2028) oder GFP- (BHUM2029) überexprimierenden Plasmid transformiert. Anschließend wurden beide Stämme einzeln in YNB-Medium mit 0,2 mM Uracil von einer OD₆₀₀ von 0,25 bis 1 (logarithmische Phase) angezogen, in gleichen Verhältnissen gemischt und schließlich auf festem YEPD- oder YNB-Medium mit Uracil ausplattiert. Nach zweitägigem Wachstum bei 30 °C wurden die resultierenden Kolonien zunächst fotografisch mit dem Fluoreszenz-Plattenleser „ImageQuant LAS 4000 Mini“ erfasst und ihre Größe mit Hilfe des Programms „ImageJ“ (Schneider et al., 2012) und der Funktion „Analyze Particle“ ermittelt. Dabei wurden eine minimale Pixelgröße von 1 und eine Rundheit von 0 bis 1 als Parameter gewählt. Die Identität der jeweiligen Kolonien wurde schließlich ebenfalls unter Verwendung des Fluoreszenz-Plattenlesers „ImageQuant LAS 4000 Mini“ mit den Filterwürfeln 575DF20 für RFP (Anregung bei 520 nm, Emission bei 584 nm) und Y515Di für GFP (Anregung bei 460 nm, Emission bei 509 nm) bestimmt. Pro Stamm wurden mindestens 50 Kolonien auf diese Weise untersucht.

5.8.7 Kreuzung von *S. cerevisiae* Stämmen

Die zu testenden Tryptophan- und Uracil-defizienten *MATa*-Stämme sowie der Histidin- und Leucin-auxotrophe *MAT α* -Teststamm YHUM266 wurden zunächst einzeln auf festem YEPD-Medium bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden die *MATa*-Stämme einerseits mit dem

Teststamm auf eine frische YEPD-Platte kreuzplattiert, sowie jeder Stamm zu Kontrollzwecken einzeln auf eine frische Platte gestempelt. Nach fünfstündiger Inkubation bei 30 °C zur Zygotenbildung wurden alle Stämme und Kreuzungen auf frisches Selektionsmedium ohne Histidin, Leucin, Tryptophan oder Uracil (SC-Trp-Ura-His-Leu-Agarplatten) überführt und für 3 d bei 30 °C kultiviert. Die resultierenden Kolonien bestehen aus diploiden *MATa/a*-Zellen, die aus einer erfolgreichen Kreuzung hervorgegangen sind.

5.8.8 Bestimmung von Proteinhalbwertszeiten: „Cycloheximide Chase“

Um die Degradationsrate von Proteinen zu bestimmen, wurden die entsprechenden *S. cerevisiae* Stämme zunächst in 25 ml YNB-Medium mit 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil von einer OD₆₀₀ von 0,25 bis 1 (logarithmische Phase) schüttelnd bei 30 °C angezogen und anschließend mit 200 µg/ml Cycloheximid, einem Translationsinhibitor, versetzt, um die Proteinneusynthese zu verhindern. Die Kulturen wurden weiterhin schüttelnd bei 30 °C inkubiert und je 1,5 OD für eine Western-Analyse in 15-minütigen Abständen für insgesamt 3 h entnommen. Auf diese Weise wurde die zeitliche Abnahme des zu untersuchenden Proteins relativ zur Ladekontrolle Cdc28 sowie die Halbwertszeit des Proteins ermittelt.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Albertin, W. and Marullo, P.** (2012). Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. *Proc Biol Sci* **279**: 2497–509.
- Aldea, M., Garí, E., and Colomina, N.** (2007). Control of cell cycle and cell growth by molecular chaperones. *Cell Cycle* **6**: 2599–603.
- Amorós, M. and Estruch, F.** (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol* **39**: 1523–32.
- Andalis, A.A., Storchova, Z., Styles, C., Galitski, T., Pellman, D., and Fink, G.R.** (2004). Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **167**: 1109–21.
- Backe, P.H., Messias, A.C., Ravelli, R.B.G., Sattler, M., and Cusack, S.** (2005). X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure* **13**: 1055–67.
- Barbero, J.L.** (2011). Sister Chromatid Cohesion Control and Aneuploidy. *Cytogenet Genome Res* **133**: 223–33.
- Bardwell, L., Cook, J.G., Voora, D., Baggott, D.M., Martinez, A.R., and Thorner, J.** (1998). Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* **12**: 2887–98.
- Barrales, R.R., Jimenez, J., and Ibeas, J.I.** (2008). Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**: 145–56.
- Bhaskaran, H. and Russell, R.** (2007). Kinetic redistribution of native and misfolded RNAs by a DEAD-box chaperone. *Nature* **449**: 1014–8.
- Birnboim, H. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–23.
- Blum, S., Mueller, M., Schmidt, S.R., Lindert, P., and Trachsel, H.** (1989). Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: Initiation factor 4A-dependent cell-free systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 6043–6.
- Bobola, N., Jansen, R.P., Shin, T.H., and Nasmyth, K.** (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* **84**: 699–709.

- Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L., and Boeke, J.D.** (1995). The *SIR2* gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev* **9**: 2888–902.
- Braus, G.H., Grundmann, O., Brückner, S., and Mösch, H.-U.** (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **14**: 4272–84.
- Brunke, S. and Hube, B.** (2012). Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol* **Epub ahead**.
- Bumgarner, S.L., Dowell, R.D., Grisafi, P., Gifford, D.K., and Fink, G.R.** (2009). Toggle involving *cis*-interfering noncoding RNAs controls variegated gene expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 18321–6.
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G.** (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615–21.
- Caponigro, G. and Parker, R.** (1995). Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes Dev* **9**: 2421–32.
- Cavalieri, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., and Polsinelli, M.** (2003). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J Mol Evol* **57**: S226–32.
- Chambers, A.L., Ormerod, G., Durley, S.C., Sing, T.L., Brown, G.W., Kent, N.A., and Downs, J.A.** (2012). The *INO80* chromatin remodeling complex prevents polyploidy and maintains normal chromatin structure at centromeres. *Genes Dev* **26**: 2590–603.
- Chan, C.S. and Botstein, D.** (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* **135**: 677–91.
- Chandarlapaty, S. and Errede, B.** (1998). Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **18**: 2884–91.
- Chen, G., Bradford, W.D., Seidel, C.W., and Li, R.** (2012). Hsp90 stress potentiates rapid cellular adaptation through induction of aneuploidy. *Nature* **482**: 246–50.
- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Vergés, E., Aldea, M., and Garí, E.** (2009). Whi3 regulates morphogenesis in budding yeast by enhancing Cdk functions in apical growth. *Cell cycle* **8**: 1912–20.
- Colomina, N., Ferrezuelo, F., Wang, H., Aldea, M., and Garí, E.** (2008). Whi3, a developmental regulator of budding yeast, binds a large set of mRNAs functionally related to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **283**: 28670–9.
- Colomina, N., Garí, E., Gallego, C., Herrero, E., and Aldea, M.** (1999). G1 cyclins block the Ime1 pathway to make mitosis and meiosis incompatible in budding yeast. *EMBO J* **18**: 320–9.

- Conlan, R.S. and Tzamarias, D.** (2001). Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J Mol Biol* **309**: 1007–15.
- Connelly, C. and Hieter, P.** (1996). Budding yeast *SKP1* encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell* **86**: 275–85.
- Cook, J.G., Bardwell, L., Kron, S.J., and Thorner, J.** (1996). Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2831–48.
- Cook, M. and Tyers, M.** (2007). Size control goes global. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 341–50.
- Cridge, A.G., Castelli, L.M., Smirnova, J.B., Selley, J.N., Rowe, W., Hubbard, S.J., McCarthy, J.E.G., Ashe, M.P., Grant, C.M., and Pavitt, G.D.** (2010). Identifying eIF4E-binding protein translationally-controlled transcripts reveals links to mRNAs bound by specific PUF proteins. *Nucleic Acids Res* **38**: 8039–50.
- Cross, F.R. and Tinkelenberg, A.H.** (1991). A potential positive feedback loop controlling *CLN1* and *CLN2* gene expression at the start of the yeast cell cycle. *Cell* **65**: 875–83.
- Cullen, P., Sabbagh Jr, W., Graham, E., Irick, M.M., Van Olden, E.K., Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L., and Sprague Jr, G.F.** (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**: 1695–708.
- Cullen, P.J. and Sprague, G.F.** (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13619–24.
- Deng, Y., Singer, R.H., and Gu, W.** (2008). Translation of *ASH1* mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes Dev* **22**: 1037–50.
- Dever, T.E., Feng, L., Wek, R.C., Cigan, A.M., Donahue, T.F., and Hinnebusch, A.G.** (1992). Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase *GCN2* mediates gene-specific translational control of *GCN4* in yeast. *Cell* **68**: 585–96.
- Dujon, B.** (1996). The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet* **12**: 263–70.
- Van Dyk, D., Hansson, G., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F.** (2003). Cellular differentiation in response to nutrient availability: The repressor of meiosis, Rme1p, positively regulates invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**: 1045–58.
- Van Dyk, D., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F.** (2005). Mss11p is a central element of the regulatory network that controls *FLO11* expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**: 91–106.
- Enserink, J.M. and Kolodner, R.D.** (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* **5**: 11.

- Esposito, R. and Klapholz, S.** (1982). Meiosis and ascospore development. In “The molecular biology of yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, pp. 211–87.
- Estruch, F.** (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469–86.
- Estruch, F. and Carlson, M.** (1990). Increased dosage of the *MSN1* gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the *SNF1* protein kinase. *Nucleic Acids Res* **18**: 6959–64.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G.F., and Käppeli, O.** (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv Microb Physiol* **22**: 123–83.
- Filbin, M.E. and Kieft, J.S.** (2010). Towards a structural understanding of IRES RNA function. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 267–76.
- Fischer, C., Valerius, O., Rupprecht, H., Dumkow, M., Krappmann, S., and Braus, G.H.** (2008). Posttranscriptional regulation of *FLO11* upon amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **8**: 225–36.
- Gagiano, M., Bauer, F.F., and Pretorius, I.S.** (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2**: 433–70.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S., and Fink, G.R.** (1999). Ploidy Regulation of Gene Expression. *Science* **285**: 251–4.
- Gari, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Futcher, B., and Aldea, M.** (2001). Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes Dev* **15**: 2803–8.
- Garrett, S., Menold, M.M., and Broach, J.R.** (1991). The *Saccharomyces cerevisiae* *YAK1* gene encodes a protein kinase that is induced by arrest early in the cell cycle. *Mol Cell Biol* **11**: 4045–52.
- Gavrias, V. and Andrianopoulos, A.** (2006). *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol Microbiol* **19**: 1255–63.
- Gebauer, F. and Hentze, M.W.** (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 827–35.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O.** (2004). Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* **2**: E79.
- Ghaemmighami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., and Weissman, J.S.** (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737–41.

- Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F., and Erard, M.** (1992). Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *FEBS* **209**: 541–8.
- Gietz, R. and Sugino, A.** (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **14**: 527–34.
- Gimeno, C.J. and Fink, G.R.** (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol Cell Biol* **14**: 2100–12.
- Gimeno, C.J. and Fink, G.R.** (1992). The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* **257**: 626.
- Glisovic, T., Bachorik, J.L., Yong, J., and Dreyfuss, G.** (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* **582**: 1977–86.
- Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., Hook, B.A., and Wickens, M.** (2007). PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p. *J Biol Chem* **282**: 109–14.
- Gonsalvez, G.B., Urbinati, C.R., and Long, R.M.** (2005). RNA localization in yeast: moving towards a mechanism. *Biol Cell* **97**: 75–86.
- Grainger, R. and Beggs, J.** (2005). Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA* **11**: 533–57.
- Granek, J.A., Murray, D., Kayikçi, O., and Magwene, P.M.** (2013). The Genetic Architecture of Biofilm Formation in a Clinical Isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**: 587–600.
- Griffioen, G. and Branduardi, P.** (2001). Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Mol Cell Biol* **21**: 511–23.
- Groes, M., Teilum, K., Olesen, K., Poulsen, F.M., and Henriksen, A.** (2002). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 2135–7.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R.H.** (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses *ASH1* mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* **18**: 1452–65.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H.** (2002). A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **30**: e23.

- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., and Fink, G.R.** (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12158–63.
- Guo, M., Aston, C., Burchett, S., and Dyke, C.** (2003). The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160. *Mol Cell* **12**: 517–24.
- Haber, J.E.** (2012). Mating-type genes and *MAT* switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 33–64.
- Hall, D.D., Markwardt, D.D., Parviz, F., and Heideman, W.** (1998). Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **17**: 4370–8.
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C., and Fink, G.R.** (2004). Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* **116**: 405–15.
- Harashima, T. and Heitman, J.** (2002). The Galpha protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic Gbeta subunits. *Mol Cell* **10**: 163–73.
- Harbison, C.T., Gordon, D.B., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Macisaac, K.D., Danford, T.W., Hannett, N.M., Tagne, J.-B., Reynolds, D.B., Yoo, J., Jennings, E.G., Zeitlinger, J., Pokholok, D.K., Kellis, M., Rolfe, P.A., Takusagawa, K.T., Lander, E.S., Gifford, D.K., Fraenkel, E., and Young, R.A.** (2004). Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99–104.
- Hartwell, L.H.** (1974). *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev* **38**: 164–98.
- Hedbacker, K. and Carlson, M.** (2008). *SNF1/AMPK* pathways in yeast. *Front Biosci* **13**: 2408–20.
- Heise, B., Van der Felden, J., Kern, S., Malcher, M., Brückner, S., and Mösch, H.-U.** (2010). The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryot Cell* **9**: 514–31.
- Hinnebusch, A.G.** (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 434–67.
- Hinnebusch, A.G.** (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**: 407–50.
- Hoffman, C.S. and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267–72.
- Hogan, D.J., Riordan, D.P., Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O.** (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol* **6**: e255.

- Hong, S.-P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M.** (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8839–43.
- Hood, H.M., Neafsey, D.E., Galagan, J., and Sachs, M.S.** (2009). Evolutionary roles of upstream open reading frames in mediating gene regulation in fungi. *Annu Rev Microbiol* **63**: 385–409.
- Hulsen, T., De Vlieg, J., and Alkema, W.** (2008). BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**: 488.
- Hutvagner, G. and Simard, M.J.** (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 22–32.
- Iost, I., Dreyfus, M., and Linder, P.** (1999). Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem* **274**: 17677–83.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., and Herskowitz, I.** (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of *ASH1* mRNA in yeast. *EMBO J* **21**: 1158–67.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., and Knop, M.** (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947–62.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y., and Whiteway, M.** (2005). Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* **344**: 43–51.
- Jansen, R.-P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K.** (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* **84**: 687–97.
- Jansen, R.-P. and Niessing, D.** (2012). Assembly of mRNA-protein complexes for directional mRNA transport in eukaryotes-an overview. *Curr Protein Pept Sci* **13**: 284–93.
- Jentoft, N.** (1990). Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**: 291–4.
- Jensen, K.B. and Darnell, R.B.** (2008). CLIP: crosslinking and immunoprecipitation of *in vivo* RNA targets of RNA-binding proteins. *Meth Mol Biol* **488**: 85–98.
- Jiang, R. and Carlson, M.** (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast *SNF1* protein kinase complex. *Genes Dev* **10**: 3105–15.
- Jiang, R. and Carlson, M.** (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* **17**: 2099–106.

- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Breitkreutz, B.-J., and Tyers, M.** (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* **297**: 395–400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M.** (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* **18**: 2491–505.
- Jungbluth, M., Renicke, C., and Taxis, C.** (2010). Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Syst Biol* **4**: 176.
- Kahana, J.A., Schlenstedt, G., Evanchuk, D.M., Geiser, J.R., Hoyt, M.A., and Silver, P.A.** (1998). The yeast dynactin complex is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells during anaphase B. *Mol Biol Cell* **9**: 1741–56.
- Kang, S. and Choi, H.** (2005). Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly(styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **46**: 70–7.
- Kataoka, T., Broek, D., and Wigler, M.** (1985). DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* **43**: 493–505.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M.L., and Cormack, B.P.** (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378–84.
- Kaye, J.A., Rose, N.C., Goldsworthy, B., Goga, A., and L'Etoile, N.D.** (2009). A 3'UTR pumilio-binding element directs translational activation in olfactory sensory neurons. *Neuron* **61**: 57–70.
- Kiledjian, M. and Dreyfuss, G.** (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* **11**: 2655–64.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E.** (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**: 963–72.
- Kobayashi, N., McClanahan, T., Simon, J.R., Treger, J.M., and McEntee, K.** (1996). Structure and Functional Analysis of the Multistress Response Gene *DDR2* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **547**: 540–7.
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R., and Sone, H.** (1998). Region of *FLO1* proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* **180**: 6503–10.
- Kormanec, J., Schaaff-Gerstenschläger, I., Zimmermann, F.K., Perecko, D., and Küntzel, H.** (1991). Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa Num1 protein. *Mol Gen Genet* **230**: 277–87.
- Kron, S.J., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**: 1003–22.

- Kuchin, S., Vyas, V., and Carlson, M.** (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol* **22**: 3994–4000.
- Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J., and Pretorius, I.S.** (1996). Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 8419–24.
- Lamprecht, I., Schaarschmidt, B., and Welge, G.** (1976). Microcalorimetric investigation of the metabolism of yeasts. V. Influence of ploidy on growth and metabolism. *Radiat Environ Biophys* **13**: 57–61.
- Lang, B.D. and Fridovich-Keil, J.L.** (2000). Scp160p, a multiple KH-domain protein, is a component of mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* **28**: 1576–84.
- Lee, P., Cho, B.R., Joo, H.S., and Hahn, J.S.** (2008). Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol Microbiol* **70**: 882–95.
- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., Zeitlinger, J., Jennings, E.G., Murray, H.L., Gordon, D.B., Ren, B., Wyrick, J.J., Tagne, J.-B., Volkert, T.L., Fraenkel, E., Gifford, D.K., et al.** (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**: 799–804.
- Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P., and Thevelein, J.M.** (2004). Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **16**: 293–9.
- Lew, D.J. and Reed, S.I.** (1993). Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* **120**: 1305–20.
- Li, F. and Palecek, S.P.** (2003). *EAP1*, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells. *Eukaryot Cell* **2**: 1266–73.
- Li, F., Svarovsky, M.J., Karlsson, A.J., Wagner, J.P., Marchillo, K., Oshel, P., Andes, D., and Palecek, S.P.** (2007). Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot Cell* **6**: 931–9.
- Linder, P. and Jankowsky, E.** (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 505–16.
- Linder, P., Lasko, P., Ashburner, M., and Leroy, P.** (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**: 121–2.
- Lipshitz, H.D.** (2009). Follow the mRNA: a new model for Bicoid gradient formation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 509–12.
- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1993). Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**: 1741–4.

- Liu, H., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1996). *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**: 967–78.
- Lo, T.L., Qu, Y., Uwamahoro, N., Quenault, T., Beilharz, T.H., and Traven, A.** (2012). The mRNA decay pathway regulates the expression of the Flo11 adhesin and biofilm formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**: 1387–91.
- Lo, W.S. and Dranginis, A.M.** (1996). *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* **178**: 7144–51.
- Lorenz, M.C., Cutler, N.S., and Heitman, J.** (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 183–99.
- Lu, C.F., Montijn, R.C., Brown, J.L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H., and Lipke, P.N.** (1995). Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **128**: 333–40.
- Lu, P., Vogel, C., Wang, R., Yao, X., and Marcotte, E.M.** (2007). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat Biotechnol* **25**: 117–24.
- Lunde, B.M., Moore, C., and Varani, G.** (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 479–90.
- Madhani, H.D. and Fink, R.G.** (1997). Combinatorial Control Required for the Specificity of Yeast MAPK Signaling. *Science* **275**: 1314–7.
- Maestre-Reyna, M., Diderrich, R., Veelders, M.S., Eulenburg, G., Kalugin, V., Brückner, S., Keller, P., Rupp, S., Mösch, H.-U., and Essen, L.-O.** (2012). Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 16864–9.
- Malcher, M., Schladebeck, S., and Mösch, H.-U.** (2011). The Yak1 protein kinase lies at the center of a regulatory cascade affecting adhesive growth and stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **187**: 717–30.
- Mandel, M. and Higa, A.** (1970). Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection. *J Mol Biol* **53**: 159–62.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F.H.-T.** (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* **272**: 2118–31.
- Marsden, S., Nardelli, M., Linder, P., and McCarthy, J.E.G.** (2006). Unwinding single RNA molecules using helicases involved in eukaryotic translation initiation. *J Mol Biol* **361**: 327–35.
- Martin, D.E., Soulard, A., and Hall, M.N.** (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor *FHL1*. *Cell* **119**: 969–79.

- Matyakhina, L., Lenherr, S.M., and Stratakis, C.A.** (2002). Protein kinase A and chromosomal stability. *Ann NY Acad Sci* **968**: 148–57.
- McCarthy, J.E.** (1998). Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1492–553.
- McCusker, D., Denison, C., Anderson, S., Egelhofer, T.A., Yates, J.R., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R.** (2007). Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nat Cell Biol* **9**: 506–15.
- McMaster, G.K. and Carmichael, G.G.** (1977). Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 4835–8.
- Miura, F., Kawaguchi, N., Sese, J., Toyoda, A., Hattori, M., Morishita, S., and Ito, T.** (2006). A large-scale full-length cDNA analysis to explore the budding yeast transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 17846–51.
- Mizunuma, M., Tsubakiyama, R., Ogawa, T., Shitamukai, A., Kobayashi, Y., Inai, T., Kume, K., and Hirata, D.** (2013). cAMP/PKA Regulates Multiple Aspects of Cellular Events by Phosphorylating Whi3 Cell-Cycle Regulator in Budding Yeast. *J Biol Chem* **Epub ahead**.
- Mohr, S., Matsuura, M., Perlman, P.S., and Lambowitz, A.M.** (2006). A DEAD-box protein alone promotes group II intron splicing and reverse splicing by acting as an RNA chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3569–74.
- Moriya, H. and Shimizu-Yoshida, Y.** (2001). Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev* **15**: 1217–28.
- Morris, R.T., O'Connor, T.R., and Wyrick, J.J.** (2010). Ceres: software for the integrated analysis of transcription factor binding sites and nucleosome positions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioinformatics* **26**: 168–74.
- Mösch, H.-U. and Fink, G.R.** (1997). Dissection of Filamentous Growth by Transposon Mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**: 671–84.
- Mösch, H.-U., Roberts, R.L., and Fink, G.R.** (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5352–6.
- Mrak, E.M. and Phaff, H.J.** (1948). Yeasts. *Annu Rev Microbiol* **2 (1 vol.)**: 1–46.
- Müller, M., Heuck, A., and Niessing, D.** (2007). Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cell Mol Life Sci* **64**: 171–80.
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M.G., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J., and Delvaux, F.R.** (2009). Phenotypic diversity of Flo

- protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res **9**: 178–90.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., and Snyder, M.** (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. Science **320**: 1344–9.
- Nash, R.S., Volpe, T., and Futcher, B.** (2001). Isolation and Characterization of *WHI3*, a Size-Control Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Cell **157**: 1469–80.
- Nasmyth, K. and Haering, C.H.** (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. Annu Rev Genet **43**: 525–58.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., and Sniegowski, P.D.** (1998). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. Can J Microbiol **44**: 1045–50.
- Palecek, S.P., Parikh, A.S., and Kron, S.J.** (2002). Sensing , signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. Yeast **148**: 893–907.
- Pan, X. and Heitman, J.** (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol **19**: 4874–87.
- Pan, X. and Heitman, J.** (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. Mol Cell Biol **20**: 8364–72.
- Pesole, G., Grillo, G., Larizza, A., and Liuni, S.** (2000). The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. Brief Bioinform **1**: 236–49.
- Peterson, C.L. and Workman, J.L.** (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. Curr Opin Genet Dev **10**: 187–92.
- Petko, L. and Lindquist, S.** (1986). Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development or germination. Cell **45**: 885–94.
- Praekelt, U.M. and Meacock, P.A.** (1990). *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. Mol Gen Genet **223**: 97–106.
- Prinz, S., Aldridge, C., Ramsey, S.A., Taylor, R.J., and Galitski, T.** (2007). Control of signaling in a MAP-kinase pathway by an RNA-binding protein. PloS One **2**: e249.
- Quenault, T., Lithgow, T., and Traven, A.** (2011). PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. Trends Cell Biol **21**: 104–12.
- Queralt, E. and Igual, J.C.** (2004). Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic cycle. Genetics **168**: 129–40.

- Ragni, E., Piberger, H., Neupert, C., García-Cantalejo, J., Popolo, L., Arroyo, J., Aebi, M., and Strahl, S.** (2011). The genetic interaction network of *CCW12*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for cell wall integrity during budding and formation of mating projections. *BMC Genomics* **12**: 107.
- Rajyaguru, P., She, M., and Parker, R.** (2012). Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins. *Mol Cell* **45**: 244–54.
- Rando, O.J. and Winston, F.** (2012). Chromatin and transcription in yeast. *Genetics* **190**: 351–87.
- Reynolds, T.B. and Fink, G.R.** (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878–81.
- Richter, J.D. and Sonenberg, N.** (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**: 477–80.
- Riezman, H., Hase, T., Van Loon, A.P., Grivell, L.A., Suda, K., and Schatz, G.** (1983). Import of proteins into mitochondria: a 70 kilodalton outer membrane protein with a large carboxy-terminal deletion is still transported to the outer membrane. *EMBO J* **2**: 2161–8.
- Riordan, D.P., Herschlag, D., and Brown, P.O.** (2011). Identification of RNA recognition elements in the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptome. *Nucleic Acids Res* **39**: 1501–9.
- Roberts, R.L. and Fink, G.R.** (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974–85.
- Roberts, R.L., Mösch, H.-U., and Fink, G.R.** (1997). 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**: 1055–65.
- Robertson, L.S. and Fink, G.R.** (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13783–7.
- Rolland, F., Wanke, V., Cauwenberg, L., Ma, P., Boles, E., Vanoni, M., De Winde, J.H., Thevelein, J.M., and Winderickx, J.** (2001). The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **1**: 33–45.
- Rolland, F., De Winde, J.H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J.M., and Winderickx, J.** (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose. kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* **38**: 348–58.
- Rose, M. and Botstein, D.** (1983). Construction and use of gene fusions to lacZ (beta-galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol* **101**: 167–80.

- Rowlands, A.G., Panniers, R., and Henshaw, E.C.** (1988). The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem* **263**: 5526–33.
- Ruiz-Echevarría, M. and Peltz, S.** (2000). The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell* **101**: 741–51.
- Rupes, I.** (2002). Checking cell size in yeast. *Trends Genet* **18**: 479–85.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.-J., Madhani, H., and Fink, G.** (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J* **18**: 1257–69.
- Rutherford, J.C., Chua, G., Hughes, T., Cardenas, M.E., and Heitman, J.** (2008). A Mep2-dependent Transcriptional Profile Links Permease Function to Gene Expression during Pseudohyphal Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **19**: 3028–39.
- Sagliocco, F.A., Vega Laso, M.R., Zhu, D., Tuite, M.F., McCarthy, J.E., and Brown, A.J.** (1993). The influence of 5'-secondary structures upon ribosome binding to mRNA during translation in yeast. *J Biol Chem* **268**: 26522–30.
- Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourdren, L., Le Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., and Jacq, C.** (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PloS One* **3**: e2293.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1992). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology* **24**: 476–80.
- Salmon, J.-M.** (1997). Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J Fermentat Bioeng* **83**: 253–60.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463–7.
- Santangelo, G.** (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 253–82.
- Schild, D., Ananthaswamy, H., and Mortimer, R.** (1981). An endomitotic effect of a cell cycle mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **97**: 551–62.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–5.
- Schulze, J.M., Jackson, J., Nakanishi, S., Gardner, J.M., Hentrich, T., Haug, J., Johnston, M., Jaspersen, S.L., Kobor, M.S., and Shilatifard, A.** (2009). Linking cell cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell-cycle regulation of H3K79 dimethylation. *Mol Cell* **35**: 626–41.

- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J.** (2010). Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **9**: 991–1008.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., and Vale, R.D.** (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 11429–34.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B.** (1986). *Methods in Yeast Genetics*. In “Cold Spring Harbor Laboratory Press”, NY.
- Sidorova, J. and Breeden, L.** (1999). The *MSN1* and *NHP6A* genes suppress *SWI6* defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **151**: 45–55.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P.** (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol* **122**: 19–27.
- Sil, A. and Herskowitz, I.** (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast *HO* gene. *Cell* **84**: 711–22.
- Sinha, H., David, L., Pascon, R.C., Clauder-Münster, S., Krishnakumar, S., Nguyen, M., Shi, G., Dean, J., Davis, R.W., Oefner, P.J., McCusker, J.H., and Steinmetz, L.M.** (2008). Sequential elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait loci conditioning high-temperature growth in yeast. *Genetics* **180**: 1661–70.
- Smith, A., Ward, M.P., and Garrett, S.** (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J* **17**: 3556–64.
- Southern, E.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503–17.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., and Futcher, B.** (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**: 3273–97.
- Stefanini, I. and Dapporto, L.** (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 13398–403.
- Sterner, D. and Berger, S.** (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 435–59.
- Storchová, Z., Breneman, A., Cande, J., Dunn, J., Burbank, K., O’Toole, E., and Pellman, D.** (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature* **443**: 541–7.

- Stratford, M. and Assinder, S.** (1991). Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* **7**: 559–74.
- Strittmatter, A.W., Fischer, C., Kleinschmidt, M., and Braus, G.H.** (2006). *FLO11* mediated filamentous growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the expression of the ribosomal *RPS26* genes. *Mol Genet Genomics* **276**: 113–25.
- Suh, N., Crittenden, S.L., Goldstrohm, A., Hook, B., Thompson, B., Wickens, M., and Kimble, J.** (2009). FBF and its dual control of *gld-1* expression in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genetics* **181**: 1249–60.
- Tarun, S.Z. and Sachs, A.B.** (1995). A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev* **9**: 2997–3007.
- Tarun, S.Z. and Sachs, A.B.** (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* **15**: 7168–77.
- Taxis, C., Stier, G., Spadaccini, R., and Knop, M.** (2009). Efficient protein depletion by genetically controlled deprotection of a dormant N-degron. *Mol Syst Biol* **5**: 267.
- Tesfaigzi, J., Smith-Harrison, W., and Carlson, D.M.** (1994). A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* **17**: 268–9.
- Teunissen, A.W. and Steensma, H.Y.** (1995). Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* **11**: 1001–13.
- Toda, T., Cameron, S., and Sass, P.** (1987a). Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**: 1371–7.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M.** (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **50**: 277–87.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350–4.
- Tyers, M., Tokiwa, G., and Futcher, B.** (1993). Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *EMBO J* **12**: 1955–68.
- Ule, J., Jensen, K., Mele, A., and Darnell, R.B.** (2005). CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* **37**: 376–86.
- Valerius, O., Kleinschmidt, M., Rachfall, N., Schulze, F., López Marín, S., Hoppert, M., Streckfuss-Bömeke, K., Fischer, C., and Braus, G.H.** (2007). The *Saccharomyces* homolog of mammalian *RACK1*, Cpc2/Asc1p, is required for *FLO11*-dependent adhesive growth and dimorphism. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1968–79.

- Veelders, M., Brückner, S., Ott, D., Unverzagt, C., Mösch, H.-U., and Essen, L.-O.** (2010). Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 22511–6.
- Van de Velde, S. and Thevelein, J.M.** (2008). Cyclic AMP-protein kinase A and Snf1 signaling mechanisms underlie the superior potency of sucrose for induction of filamentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **7**: 286–93.
- Vergheze, J., Abrams, J., Wang, Y., and Morano, K.A.** (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 115–58.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., and Delvaux, F.R.** (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 197–205.
- Verstrepen, K.J. and Klis, F.M.** (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5–15.
- Verstrepen, K.J., Reynolds, T.B., and Fink, G.R.** (2004). Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**: 533–40.
- Vyas, V. and Kuchin, S.** (2003). Snf1 kinases with different β -subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Mol Cell Biol* **23**: 1341–8.
- Wang, H., Garí, E., Vergés, E., Gallego, C., and Aldea, M.** (2004). Recruitment of Cdc28 by Whi3 restricts nuclear accumulation of the G1 cyclin-Cdk complex to late G1. *EMBO J* **23**: 180–90.
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R., and Garrett, S.** (1995). *SOK2* may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol Cell Biol* **15**: 6854–63.
- Weber, V., Wernitznig, A., Hager, G., Harata, M., Frank, P., and Wintersberger, U.** (1997). Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy. *FEBS* **249**: 309–17.
- Weiss, R., Kukora, J., and Adams, J.** (1975). The Relationship Between Enzyme Activity, Cell Geometry, and Fitness in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 794–8.
- Wek, R.C., Jackson, B.M., and Hinnebusch, A.G.** (1989). Juxtaposition of domains homologous to protein kinases and histidyl-tRNA synthetases in GCN2 protein suggests a mechanism for coupling *GCN4* expression to amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4579–83.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., and Sachs, A.B.** (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**: 135–40.
- Winey, M., Goetsch, L., Baum, P., and Byers, B.** (1991). *MPS1* and *MPS2*: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J Cell Biol* **114**: 745–54.

- Wintersberger, U., Kühne, C., and Karwan, A.** (1995). Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy. *Yeast* **11**: 929–44.
- Wolf, J.J., Dowell, R.D., Mahony, S., Rabani, M., Gifford, D.K., and Fink, G.R.** (2010). Feed-forward regulation of a cell fate determinant by an RNA-binding protein generates asymmetry in yeast. *Genetics* **185**: 513–22.
- Wu, J., Suka, N., Carlson, M., and Grunstein, M.** (2001). TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol Cell* **7**: 117–26.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.-M.** (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* **426**: 468–74.
- Yang, X., Jiang, R., and Carlson, M.** (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J* **13**: 5878–86.
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T., and Shimizu, H.** (2009). Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 32–44.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R.** (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* **42**: 27–81.
- Zeller, C.E., Parnell, S.C., and Dohlman, H.G.** (2007). The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem* **282**: 25168–76.
- Zipor, G., Haim-Vilmovsky, L., Gelin-Licht, R., Gadir, N., Brocard, C., and Gerst, J.E.** (2009). Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 19848–53.
- Zupancic, M.L., Frieman, M., Smith, D., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., and Cormack, B.P.** (2008). Glycan microarray analysis of *Candida glabrata* adhesin ligand specificity. *Mol Microbiol* **68**: 547–59.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Regulation der zellulären Differenzierung und Ploidie in *Saccharomyces cerevisiae*“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Außerdem habe ich mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Sarah Schladebeck)

VIELEN LIEBEN DANK...

- ... Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die Bereitstellung des Projektes, wertvollen Hilfestellungen und zahlreichen Anregungen sowie für die schweizerische Fröhlichkeit und Motivationsfähigkeit.
- ... Prof. Dr. Torsten Waldminghaus für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und den Blick hinter die Kulissen.
- ... Prof. Dr. Michael Bölker, Prof. Dr. Michael Feldbrügge und Dr. Martin Thanbichler für die hilfreichen Tipps und anregenden Diskussionen während der „IMPRS Committee Meetings“ sowie Prof. Dr. Uwe Meier und Dr. Martin Thanbichler für die Bereitschaft meiner Prüfungskommission anzugehören.
- ... Dr. Patrick Berndt und Dr. Raphael Birke für die Hilfe während der globalen Transkriptprofile, Dr. Philipp Yu für die Unterstützung bei der FACS-Analyse sowie Mario Malcher für sämtliche Hilfestellungen und Musikerfahrungen.
- ... der IMPRS für die finanzielle Unterstützung und einen Blick über den Tellerrand hinaus auf so manche „Rice Paddies“, Methanotrophe, -phile und -phobe Organismen sowie Termitendärme und die Fülle an interessanten Persönlichkeiten aus aller Welt.
- ... der gesamten AG Mösch und Bölker mit all ihren aktuellen und ehemaligen Mitgliedern für offene, lächelnde Gesichter, eine lebhafte und spannende Arbeitsatmosphäre, den ein oder anderen ausgelassenen Abend mit Mördern und Schönheitschirurgen sowie Foul-trächtigen, idyllischen Fußballturnieren. Außerdem Dr. Christof Taxis und Dr. Stefan Brückner für die fleißige Weitergabe von Laborweisheiten aller Art.
- ... dem Labor mit der seltsamen, z. T. obszönen Geräuschkulisse...wenn Worte nicht mehr ausreichen, lass die „Soundmaschine“ sprechen...im Speziellen Didi, Julia, die NUR im Verhältnis zu mir kleine Sarah und all den anderen temporären Mitbewohnern für eine wirklich lustige, ehrliche, unterstützende, aufbauende und ausgleichende Zeit...und natürlich für diverseste Schminktipp. Mit euch kann man gut Himbeeren sammeln ;)
- ... der Mittwochs-Gang Ulli, Frank, Anja und Flo fürs Aufbauen, Mitreißen, Vertrauen und schlichtweg ihre Freundschaft während eines Jahrzehntes Marburg und darüber hinaus. Don't dream it...be it.
- ... den KBitches Jana, Karo, Lea und Claudi, die gefühlt schon vom Anbeginn der Zeit immer für mich da waren, wo auch immer der Schuh drückt, der Kragen platzt oder alles übersprudelt vor Freude.
- ... meiner Familie und v. a. meinen Eltern, die mich immer mit aller Kraft auf sämtlichen Ebenen unterstützt haben, damit aus dem Kind was Ordentliches wird. Es ist schon erstaunlich, wie bedingungslos man an eine Person glauben kann. Außerdem meiner Schwester Nadine und meinen Großeltern dafür, dass sie einfach da sind.
- ... Christian, der ohne es zu wissen einfach großartig ist.
- ... letztendlich all diejenigen Personen, die über die Jahre in mein Leben getreten sind, mich bewegt, berührt und geprägt haben und die ich nicht mehr missen möchte.

LEBENS LAUF

Die Seite 174 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.